



# Especialidad en Medicina Legal

Directora de la carrera: Prof. Dra. Alicia Beatriz Vermé

Trabajo Final Integrador:

**EI PELO Y LA OBTENCIÓN DEL PERFIL DE ADN COMO  
PRUEBA EN CIENCIA FORENSE.**

ALUMNO.

Dra. Betina Nemcik

TUTOR.

Dra. Carolina Tomasso

CO-TUTOR.

Lic. Mariana Quatrin

Año de cohorte.

2020-2021

Sede.

Buenos Aires.

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco el espacio y tiempo brindados por la Dra. María Mercedes Lojo en la Asesoría Pericial de La Plata, a la Licencia Mariana Quatrin que con su pasión por la genética y paciencia logro trasmitirme sus conocimientos para poder llevar a cabo la realización de este proyecto y a la Dra. Carolina Tomasso que acepto dirigirme en el mismo.

A mi esposo Nicolás, a mis hijos Sofía y Lucas.

*Allá por donde pise, todo lo que toque, todo lo que deje tras su paso, aun inconscientemente, servirá de prueba silenciosa contra él. No sólo sus huellas dactilares o las huellas de sus pisadas, sino también su cabello, la fibra de sus prendas de vestir, el vidrio que rompa, las marcas de las herramientas que utilice, los rasguños en la pintura, la sangre o el semen que deje o recoja, todos estos elementos, entre otros, serán testigos mudos contra él. Son pruebas que no olvidan. No se dejan confundir por la emoción del momento. Aunque no haya testigos humanos, ellas están ahí. Son pruebas concretas. Las pruebas materiales no pueden equivocarse ni pueden prestar falso testimonio, no pueden estar totalmente ausentes. Sólo su interpretación puede ser errónea. **Sólo el hecho de que el ser humano no las encuentre, las estudie y las interprete debidamente puede mermar su valor.***

*Kirk Paul,*

*Crime investigation, (1953).*

## INDICE

RESUMEN. ....	6
Palabras Claves: Pelo- ADN- Genética Forense-Muestras.....	7
INTRODUCCION. ....	8
LOS SERVICIOS DE CRIMINALÍSTICA Y EL PROCESO DE INVESTIGACIÓN DE LA ESCENA DEL DELITO.....	8
CONCEPTO DE LA CADENA DE CUSTODIA.....	9
CRITERIOS DE ADMISIBILIDAD, SOLICITUD DE ESTUDIO.....	9
PROTECCION Y LEVANTAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	11
Precauciones durante el levantamiento. ....	11
Levantamiento de la evidencia en la escena del crimen, indicios tricológicos:.....	12
Muestras biológicas para análisis genético, apéndices pilosos dubitados: .....	12
EL FILAMENTO PILOSO Y SU UTILIDAD COMO MUESTRA FORENSE.....	13
Embriología del pelo. ....	13
Estructura del folículo piloso.....	14
Pigmentación del cabello. ....	15
Formación y crecimiento de un cabello. ....	17
Actividad cíclica de los folículos pilosos. ....	17
Diferenciación y desintegración celular. ....	19
EL PELO COMO EVIDENCIA FORENSE. ....	20
EL ADN CELULAR Y LOS DISTINTOS TIPOS DE SECUENCIAS EN EL GENOMA. ....	23
POLIMORFISMO DEL ADN Y SU UTILIDAD EN CIENCIAS FORENSES PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA.....	27
EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LAS TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN CIENCIA FORENSE. ....	31
LOS MARCADORES MICROSATÉLITES Y LA CONSTRUCCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO.....	34
ANÁLISIS DEL GENOTIPO STR POR ELECTROFORESIS CAPILAR.....	38
IDENTIFICACIÓN DEL RASTRO BIOLÓGICO A PARTIR DEL GENOTIPO STR...	41
MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA EL ANÁLISIS FORENSE.....	42
Extracción orgánica. ....	43

Extracción con Chelex.....	44
Resinas Magnéticas.....	44
Columnas de Purificación.....	45
Tarjetas FTATM.....	46
OBJETIVO GENERAL.....	48
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	48
MATERIAL Y METODOS.....	48
Recepción, variables y selección de muestras para su procesamiento.....	49
Extracción de ADN, cuantificación y genotipado de ADN.....	50
Análisis de los perfiles obtenidos.....	50
RESULTADOS.....	51
ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	52
COMPARACION MORFOLOGICA DE DOS POBLACIONES EN ESTUDIO.....	55
EFICIENCIA EN LA OBTENCIÓN DE PERFILES GENÉTICOS A PARTIR DE LAS MUESTRAS Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EVALUADOS.....	59
Bulbos de pelos arrancados.....	59
Comparación entre Marcadores.....	60
Bulbos de pelos caídos.....	61
a) Cuantificación por PCR Real Time.....	61
b) Recuperación de perfiles en los pelos de caída espontánea.....	61
CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXOS.....	67

## **RESUMEN.**

El pelo es una prueba muy común de encontrar en las escenas del delito. Los seres humanos pierden aproximadamente 100 cabellos por día, ya sea por caída espontánea, arrancados, por transferencia o por contacto físico. Es una muestra ubicua, y puede ser de importancia para el establecimiento de asociaciones entre los individuos, una persona y el entorno; sin embargo su utilidad como prueba en ciencias forenses es limitada, en el presente trabajo evaluamos variables que pueden ser pautas para mejorar la utilidad como prueba.

El filamento piloso constituye una muestra única e indivisible para el análisis del ADN con fines de identificación individual. Este tipo de material biológico presenta un crecimiento cíclico y tiene estadios de crecimiento definidos. Cuando se trata de filamentos de caída espontánea la eficiencia en la obtención de perfiles ADN completos a partir de un bulbo es limitada. Las dificultades se relacionan principalmente con la cantidad y la calidad del ADN nuclear presente relacionadas con las características biológicas del filamento tales como estadios de crecimiento y factores ambientales.

Las técnicas de ADN se han convertido en unos de los pilares de la criminalística actual. La mayoría de las investigaciones giran en torno al intercambio de muestras biológicas-autor-victima-escena del crimen.

Los filamentos pilosos representan un desafío importante en la validación de los métodos empleados en genética forense para la extracción y purificación del ADN. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la relación entre la prueba de perfil de ADN y el pelo como muestra forense para lo cual fue necesario tener una comprensión de los métodos utilizados para la recuperación de ADN y las características biológicas de los filamentos pilosos. Para poder evaluar los distintos métodos de extracción de ADN, se tuvieron en cuenta algunos factores variables que podrían afectar los resultados, con el propósito de disminuir al mínimo el efecto dependiente del material de partida.

La evidencia del cabello solo tendrá valor cuando se sume a otra evidencia.

La importancia de los resultados de los exámenes del cabello depende de varios factores como: del método de recolección de las pruebas utilizadas en el lugar del

crimen, de las pruebas técnicas de procesamiento empleadas, de la metodología del proceso de examen de pelo, de la no contaminación y preservación segura de la muestra, y de la experiencia del profesional que examine el pelo.

Si bien hay protocolos de actuación, a nuestro conocimiento no hay bibliografía que reúna en detalle esta muestra particular con la obtención y su valor como prueba forense.

Tener una comprensión del material a tratar y su procesamiento permite plantear consensos para mejorar las condiciones y oportunidades de obtener resultados que puede ser de gran importancia en la investigación forense.

**Palabras Claves: Pelo- ADN- Genética Forense-Muestras**

## **INTRODUCCION.**

El levantamiento de los rastros e indicios es vital para una correcta investigación criminal, sin una adecuada articulación, la prueba puede perderse, conduciendo a su fracaso. Un adecuado tratamiento de la evidencia reduce los márgenes de error para la identificación de los responsables de los delitos.

La recolección como el registro apropiado sirve para configurar los anclajes necesarios para determinar que sucedió, cómo y cuándo se cometió un delito. De esto resulta la necesidad de su correcto tratamiento y procesamiento. La importancia del protocolo de actuación en los primeros momentos de la investigación se fundamenta en minimizar los errores que puede llevar a no esclarecer un hecho, a la impunidad o a la condena de un inocente.

## **LOS SERVICIOS DE CRIMINALÍSTICA Y EL PROCESO DE INVESTIGACIÓN DE LA ESCENA DEL DELITO**

La función de los servicios de criminalística comienza a desarrollarse en la escena del delito con el reconocimiento y la recogida de las pruebas materiales. Continúa con su análisis y la evaluación de los resultados en un laboratorio, y la presentación de las conclusiones a los jueces, fiscales, abogados y demás personas que necesiten la información concreta. Desde los que realizan la primera intervención en la escena del delito hasta los usuarios finales de la información, todo el personal que intervenga debe contar con suficientes conocimientos del proceso criminalístico, las disciplinas científicas y los servicios especializados que prestan los laboratorios forenses.

La investigación de la escena del delito es un proceso que tiene como objetivo captar la escena del delito tal como se presenta en el primer momento y reconocer y recoger todas las pruebas materiales que puedan resultar pertinentes para resolver el caso.

Los primeros en intervenir en la escena del delito, desempeñan un papel fundamental en todo el proceso de investigación de la escena del delito. Sus funciones iniciales son preservar la integridad de la escena de las pruebas. También es parte de sus

funciones preparar la documentación inicial sobre la escena del delito, las pruebas y todas las actividades que se realicen en dicha escena.

En la escena del delito la organización y coordinación de las tareas se fundamenta en una evaluación inicial de la escena, que se efectúa antes de que empiece la actividad criminalística propiamente dicha. La organización y la coordinación se mantienen durante toda la investigación y comprenden un análisis de lo que debe hacerse (es decir, la sucesión cronológica de actuaciones, las prioridades, etc.), las personas que están autorizadas a tener acceso a la escena (es decir, sólo tendrá acceso el personal que desempeñe un papel esencial en la investigación de la escena del delito y en la atención médica de las víctimas que allí se encuentren), la atribución de las distintas tareas y de la responsabilidad de su ejecución (por ejemplo, la designación de un jefe o responsable, descripción de las funciones y cometidos, la asignación de tareas y la necesidad de personal especializado), y la manera de llevar a cabo las tareas necesarias (por ejemplo, los procedimientos aplicables, la necesidad de herramientas y equipo especiales y los canales de comunicación necesarios).

La preservación de la escena y de las pruebas tiene como objetivo la aplicación de medidas de protección y de prevención de la contaminación adecuada para reducir al mínimo las alteraciones de la escena y de las pruebas.

### **CONCEPTO DE LA CADENA DE CUSTODIA**

Se entiende por ella la documentación cronológica y minuciosa de las pruebas para establecer su vinculación con el presunto delito. Desde el principio hasta el final del proceso científico policial es fundamental poder demostrar cada medida adoptada para garantizar la “trazabilidad” y la “continuidad” de las pruebas desde la escena del delito hasta la sala del tribunal. Se considera que la cadena de custodia es el punto débil de las investigaciones criminales.

### **CRITERIOS DE ADMISIBILIDAD, SOLICITUD DE ESTUDIO.**

Cada muestra debe llegar al laboratorio correctamente identificada y debidamente acondicionada en su contenedor a los fines de garantizar la autenticidad e integridad

de la misma. Cada muestra y su contenedor deben constar al menos de los siguientes datos:

Causa/oficio e identificación particular.

Debe venir acompañada de su correspondiente planilla de cadena de custodia, completada y firmada por cada uno de los actores intervinientes en las etapas previas.

Para cada caso las muestras deberán venir acompañadas del oficio correspondiente, en el que deberá constar: dependencia judicial interviniente, expediente, carátula, solicitantes, estudio solicitado y los elementos remitidos para el análisis.

En caso de derivaciones de muestras indubitadas, estas deben venir acompañadas de su correspondiente acta de conformidad en la que debe constar: fotografía, impresión digital, DNI, firma y aclaración de la persona que dona su muestra biológica, y/o su representante legal en caso de menores e incapaces.

Aspectos técnicos.

Todos los envases (tubos, sobres, etc.) deben ser rotulados (en caso, que sea necesario) con marcador indeleble. No se aceptarán muestras donde se observen envases o envoltorios rotos, líquidos derramados o volcados, debido a que no se encuentra garantizada la integridad de la muestra.

Deben respetarse todas las medidas para recolección, envasado y transporte detalladas en el presente protocolo. (1)

(1) Nota: se sugiere remitir copia de los informes bioquímicos que se hayan realizado a las muestras.

El/los solicitantes del estudio deben detallar específicamente qué tipo de estudio se busca realizar y cuál es la finalidad del mismo (puntos periciales, cotejo entre evidencias, cotejo entre evidencias e individuos involucrados en la causa, identificación con familiares directos u objetos, especificando el tipo de vínculo biológico que se busca establecer, etc.). Para recibir asesoramiento sobre el pedido de análisis, debe comunicarse telefónicamente al laboratorio.

## PROTECCION Y LEVANTAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Son numerosos los procesos que pueden afectar la integridad de una muestra y por lo tanto la posible obtención de perfiles genéticos. Los mismos se incrementan cuando el levantamiento y envío al laboratorio se lleva a cabo de una forma errónea. Estos procesos son:

- a. Contaminación por material biológico humano
- b. Transferencia de indicios biológicos
- c. Contaminación por microorganismos
- d. Contaminación química.

### Precauciones durante el levantamiento.

Esterilizar Material, alcohol 70% y/o encendedor (pinzas). Dejar enfriar antes de tomar la muestra (degradación de ADN).

Para evitar contaminación.

Usar guantes durante todo el proceso de levantamiento, cambiarlos cada vez que toma nueva evidencia.

Usar recipientes para guardar cada muestra, a pesar de encontrarse muy próximas o juntas.

Para evitar degradación de ADN.

No exponer las muestras biológicas a la luz UV (> 2 min)

Pb. Luminol

Toma de indicios biológicos en el lugar de los hechos.

- Aislar y proteger, lo más rápidamente posible la escena del delito
- Recoger, si es posible, en primer lugar los indicios biológicos

- Usar guantes limpios que deben cambiarse con frecuencia.
- Evitar hablar o estornudar sobre las muestras. Usar mascarilla.
- Usar bata u otro tipo de ropa protectora.
- No añadir conservantes a las muestras.
- Dejar secar a temperatura ambiente previamente a ser empaquetadas.
- Todas las muestras deben ser guardadas en forma individual, aunque hayan sido recogidas en lugares muy próximos o estuvieran juntas.
- Empaquetar en bolsas de papel o cartón, evitar las bolsas de plástico, que condensan la humedad y favorecen la proliferación de bacterias que degradan el ADN.

#### **Levantamiento de la evidencia en la escena del crimen, indicios tricológicos:**

- 1) Utilizar fuente de iluminación y ampliación visual (lupas) para buscar los indicios tricológicos.
- 2) Colectar cada indicio con pinzas limpias o mano utilizando guantes, sin dañar la muestra, y colocar cada uno por separado en sobres de papel.

En todos los casos en los que deba recolectarse y transportarse cualquier tipo de material cadavérico y que, por alguna situación extrema, no pueda ser conservado en cadena de frío, debe colocarse en un frasco de boca ancha con NaCl (sal de mesa, fina o gruesa), cubriendo la totalidad de la muestra.

#### **Muestras biológicas para análisis genético, apéndices pilosos dubitados:**

- 1) Colectar con pinzas plásticas o de punta de goma estéril, o cualquier otro método de colección, colocando uno o varios (siempre que se encuentren juntos, en un mismo lugar) en un papel pequeño.
- 2) Doblar el papel cuidadosamente, sin comprometer la morfología.
- 3) Introducir en un sobre de papel. No usar cinta de pegar ya que puede adherirse el bulbo, perdiendo la muestra, y mantener a temperatura ambiente.

La recolección de vello púbico debe realizarse del siguiente modo:

- 1) Realizar peinado de vello púbico y recogida de pelos dubitados sobre un papel.
- 2) Guardar cada grupo de pelos por separado; no pegar con cinta.
- 3) Embalar en sobre de papel debidamente rotulado y sellado.

## **EL FILAMENTO PILOSO Y SU UTILIDAD COMO MUESTRA FORENSE**

El pelo puede definirse como un filamento largo y delgado que constituye un anexo de la piel formado por queratina y que adopta diversas configuraciones (cabello, ceja, etc.). Morfológicamente se lo puede describir por un tallo cilíndrico y una raíz contenida en una depresión llamada folículo piloso. La base de la raíz tiene un ensanchamiento denominado el bulbo piloso que se asienta sobre la papila pilosa y la encierra a modo de gancho. Se hallan presentes en varias regiones del cuerpo con características distinguibles y tienen un crecimiento cíclico.

### **Embriología del pelo.**

La epidermis primitiva de un embrión humano comienza a organizarse en clústeres de células para la producción del pelo alrededor de 9 a 12 semanas de gestación. Un grupo discreto de células se agrupan en la zona basal primitiva (ectodermo) de la piel, la epidermis comienza a formar invaginaciones hacia la dermis subyacente (para formar “capuchón” o “gancho”; la misma crece hacia abajo hasta encontrarse con el clúster de células mesodérmicas que ulteriormente formarán la papila dermal, tejido conectivo, como las cubiertas fibrosas del folículo. La proliferación ininterrumpida de las células epiteliales en la base del tallo empuja el pelo hacia arriba y hacia el final del tercer mes aparecen los primeros pelos en la superficie denominado lanugo, antes del nacimiento se desprenden excepto en la zona de las cejas, párpados y cuero cabelludo, aquí persiste el vello y adquieren mayor calibre y longitud. Luego son reemplazados más tarde por pelos más gruesos que se originan en los folículos

pilosos neoformados. Después del nacimiento no se forman folículos pilosos. En la pubertad por influencia hormonal masculina aparecen vellos gruesos en las axilas y el pubis, en los varones también en la cara y en extensión variable, en otras partes del cuerpo, estos reciben el nombre de pelos terminales para diferenciarlos de lanugo y vello.

La papila dermal está compuesta principalmente por fibrocitos de origen mesodérmico y a través del factor de crecimiento de secreción influencia a la formación de la matriz celular en el bulbo del pelo, pero no hay células de la papila dermal que contribuyan al eje del pelo.

Las células en el bulbo se dividen cada 23 a 72 horas, y son dispuestas de una forma concéntrica inmediatamente sobre la papila dermal.

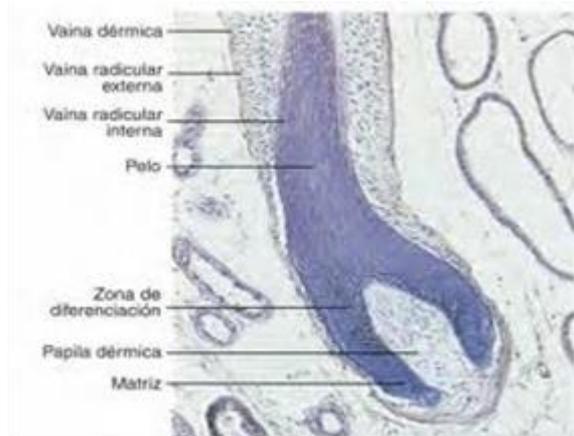
### **Estructura del folículo piloso.**

El folículo piloso es una estructura epitelial rodeada de una condensación de tejido conectivo. En la parte más profunda de la invaginación epidérmica o prolongación epitelial se encuentra un cúmulo de células o matriz germinativa del folículo piloso que queda sobre la papila de tejido conectivo, que lleva capilares a su zona central constituyendo una fuente de líquido tisular.

Células periféricas de la invaginación se tornan cúbicas y dan origen a la vaina epitelial radicular externa del pelo; la vaina radicular dérmica es formada por el mesénquima adyacente que cerca de la superficie muestra todas las capas epidérmicas de la piel delgada, y en un plano profundo no posee algunas capas superficiales de la epidermis como la queratina blanda. En el fondo solo consta de estrato germinativo de la epidermis. Por lo general suele estar unido a esta vaina un pequeño músculo liso llamado erector del pelo también derivado del mesénquima.

Un pelo terminal consiste en una medula central de queratina blanda y en ella las células cornificadas suelen estar separadas entre sí donde puede haber aire o líquido entre las células medulares; y una cutícula, entre ambas se encuentra una corteza de queratina dura. Algunos cabellos prácticamente no contienen medula.

Figura 1: Corte longitudinal de un bulbo piloso



La cutícula consiste en células muy delgadas, aplanadas a manera de escama, dispuestas en la superficie como placas con un borde libre dirigido hacia arriba que se solapan con los bordes libres de las células similares que recubren la vaina radicular externa y cuyos bordes libres se dirigen en sentido descendente, disposición que dificulta el arrancamiento de cabello sin arrastrar parte de la vaina radicular interna.

La queratina es una escleroproteína fibrosa, derivada del ectodermo y es el principal constituyente de la epidermis, pelo, uñas, tejidos córneos y la matriz orgánica del esmalte de los dientes; contiene azufre, aminoácidos y cistina, es insoluble en agua y resistente a la acción de ácidos y álcalis; tampoco tiene afecto la acción de la pepsina, la tripsina y otras proteínas proteolíticas. A las células epidérmicas que sintetizan queratina se las denomina queratinocitos. Se puede diferenciar queratina blanda de la queratina dura, tienen características físicas y químicas diferentes. Ambas aparecen en los folículos pilosos. La queratina blanda cubre la piel en su totalidad y la queratina dura aparece solo en algunas de las faneras, esto es, uñas, cutículas y corteza de cabellos en el hombre, en plumas garras y pezuñas en animales; es permanente y no se descama, no es reactiva químicamente y contiene mayor cantidad de cistina y enlaces disulfuros que la blanda.

### **Pigmentación del cabello.**

La melanina es un pigmento negro o pardo, amorfo, que se halla en la piel, el cabello, la capa corioide del ojo, la sustancia negra del encéfalo y los tumores melánicos. Se produce por polimerización de productos de la oxidación de la tiroxina (aminoácido

aromático homocíclico), el dihidroxifenilo o 3,4,-dihidroxifenilamina (dopa) que se produce por oxidación de la tiroxina.

Las células epidérmicas que sintetizan melanina se las denomina melanocitos, la enzima interviniente es la tirosinasa, cuya falta de síntesis causa la falta pigmento en el cabello de ancianos. Los melanocitos encontrados en el bulbo son células de una alta demanda de energía, conteniendo gran número de mitocondrias.

Los melanocitos están distribuidos en la matriz de un folículo cerca de la papila y forman prolongaciones citoplásmicas que aportan melanina a las células epiteliales por queratinización, se transformaran en la corteza y medula pilosa.

Al microscopio se observan tres tonos de pigmentos, el negro, pardo o café y amarillo. Este último recibe el nombre de feomelanina y su formación parece estar regida por genes distintos que los que controlan la formación de las melaninas negras y pardas. Las vías metabólicas que intervienen en su formación son distintas de las que producen la melanina negra y parda.

Durante el desarrollo fetal los melanocitos derivan de la cresta neural de la epidermis primitiva (mesectodermo), y se distribuyen azarosamente. Un grupo de melanocitos activos llegan a concentrarse en la porción ectodérmica del clúster de células del bulbo que ulteriormente llegara a ser la matriz del bulbo. Los melanocitos por encima de la papila se dividen despacio, en contraste con sus células vecinas en la matriz del bulbo germinal; los melanocitos se hallan intercalados entre células que forman el eje y migran hacia arriba. Durante la su maduración forman brazos dendríticos que contienen mitocondrias y melanosomas. Estos procesos dendríticos son engolfados por endocitosis por células pre cortical, las cuales se mueven desde la matriz de células indiferenciadas hacia su último destino en el eje queratinizado.

Inmediatamente luego de la diferenciación las células corticales comienzan una intensa síntesis de proteínas y la producción de filamentos de queratina, el gasto energético requiere numerosas mitocondrias.

Las células corticales que se hallan por debajo de la cutícula llevan mitocondrias de al menos dos procedencias distintas, aquellas provenientes de las células de la matriz celular del bulbo y las provenientes de los melanocitos, por lo que es potencialmente

probable la heteroplasmia a lo largo del eje del pelo o en pelos originados del mismo folículo.

Los melanocitos no llegan a ser parte del eje, más bien quedan en el sitio de proliferación celular como en la matriz del bulbo arriba de la papila, produciendo melanosomas y nuevas mitocondrias, las células corticales de vida corta están destinadas a sacos deshidratados con fibras de queratina.

### **Formación y crecimiento de un cabello.**

Para que el cabello crezca en un folículo es necesario que proliferen las células de la matriz germinativa, lo cual obliga a las células más superiores de dicha matriz a ocupar el interior de la vaina radicular externa. Las células son desplazadas hacia arriba, se alejan cada vez más de la papila que es su fuente de nutrición y se queratinizan. Las células que se transforman en la cutícula de la corteza del cabello que es queratina dura, lo hacen sin la síntesis de gránulos de queratohialina. El área celular en la cual ocurre la transición de las células en queratina dura recibe el nombre de zona queratogena.

Vaina radicular interna se forma por células en proliferación de la matriz que asume forma de una vaina tubular celular que es desplazada hacia arriba alrededor del pelo, separada de la vaina radicular externa. Se extiende solo hasta un punto intermedio de la altura del folículo y está formada por queratina blanda y en consecuencia se observan gránulos de queratohialina en las células en esta región los gránulos suelen llamarse también trichohialina y en vez de ser basófilos captan un color rojo.

### **Actividad cíclica de los folículos pilosos.**

El crecimiento del cabello humano es cíclico con estadios de crecimiento, reposo, muerte y regeneración bien definidos. El ciclo activo de crecimiento denominado anágeno puede durar tanto como 2 a 7 años en la cabeza humana alrededor de 6 meses en ceja, brazos y tronco.

El cabello de la cabeza humana crece un promedio de 0.35 mm por día o más de 300 mm en un ciclo de crecimiento promedio. Luego de un periodo de crecimiento

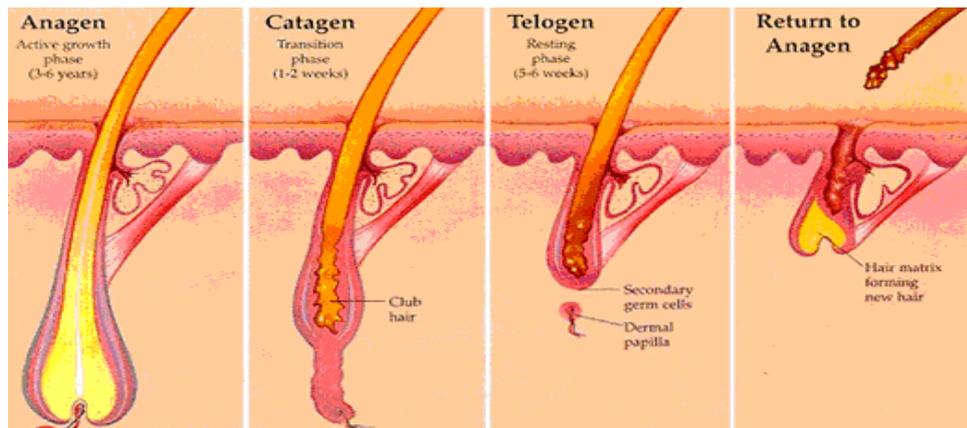
programado rápido donde las células de la matriz germinativa proliferan y se diferencian, y el cabello aumenta de longitud, le sigue una fase de reposo (catágeno). Esta fase de regresión es establecida por la terminación de la mitosis en las células de la matriz celular del bulbo. Los melanocitos se inactivan. La melanogénesis cesa previa a la última división mitótica, comenzando así la fase telógeno, en la cual se hallan la mayoría de las evidencias forenses. La raíz del pelo se desprende de su matriz y se desplaza hacia arriba del folículo y en un momento dado se halla en una zona de fijación secundaria en la vaina radicular externa; el extremo inferior del cabello se acerca al cuello del folículo. Este evento marca el comienzo de telógeno, y como resultado de esta fase la raíz se encoge a 1/3 comparada con la de la fase anágeno. La parte más profunda de la vaina radicular externa se contrae y el pelo queda fuera del folículo. Alrededor del tiempo en que ocurre este proceso, las partes profundas de la vaina radicular externa crecen de nuevo hacia abajo, donde se inicia una nueva formación germinal o brote pro-anagénico. Hay reportes que esta nueva unidad germinal de células tienen su origen en el abultamiento de la raíz o donde el músculo erector se inserta en el folículo. Un nuevo folículo se desarrolla debajo de la asociación de la raíz durante aproximadamente 3 meses de duración de la fase telogénica. Finalmente una nueva fase anagénica comienza.

Los animales forman y eliminan pelos cada año; en humanos la actividad cíclica dura de 2 a 3 años en cuero cabelludo antes de comenzar con la fase de reposo y muerte que dura aproximadamente 4 meses, sin embargo en otras partes del cuerpo esto puede variar, por ejemplo los pelos de las cejas crecen durante 1 o 2 meses y la fase de reposo es de 3 a 4 meses; otra de las diferencias es que la foliculogénesis primaria es azarosa produciéndose un mosaico de folículos en diferentes estados de desarrollo en la piel. Esta independencia en la fase del estado de desarrollo se mantiene en el adulto.

En una cabeza saludable, del 80 al 90% de los folículos se encuentran en la fase de anágeno, 2% catógeno y 10 al 18% en la fase de telógeno. Entre los 15 y 30 años crece a una velocidad promedio de 1 cm por mes, luego disminuye entre los 50 y 60 (Ham W. 1983).

Por día se caen en promedio 100 pelos. El continuo crecimiento y remplazo de los pelos humanos involucra complejos eventos de transformación y regeneración celular. Las causas naturales de pérdidas de pelos se dan por, disposición hereditaria, por la edad y aumento de la hormona dihidrostetosterona dentro del folículo piloso.

Figura 2: Estadios de crecimiento del folículo piloso.



### Diferenciación y desintegración celular.

Las células que forman el eje comienzan a diferenciarse y se desprenden por arriba de la matriz del bulbo germinal tomando luego un rol distintivo como células diferenciadas de la cutícula, células medulares y células corticales del eje del pelo. La mayor parte del eje maduro es compuesto por quitina, una proteína estructural fibrilar perteneciente a 4 familias multigenicas.

La región totalmente queratinizada comienza arriba del nivel del bulbo; el eje maduro está compuesto por cutícula, córtex, y medula. Las células están muertas y compuestas enteramente por fibrillas de queratina embebidas en una matriz amorfa de restos celulares.

El córtex comprende la masa del eje del pelo. Células pre corticales o queratinocitos comienzan una intensa actividad de síntesis con aparentes tonofilamentos de queratina en el citoplasma inmediatamente después de la diferenciación, pueden verse numerosas mitocondrias. Las células precorticales son las receptoras de melanosomas y quizás de mitocondrias de los melanocitos estacionarios.

Entrando en la zona de queratinización (por arriba del abultamiento) el diámetro de las células corticales se reduce un 25% debido a la deshidratación y contracción de las fibrillas en el citoplasma. En este punto ocurre la histólisis con la pérdida del ADN del núcleo, mitocondrias y ribosomas comienzan a desintegrarse. La muerte de las células corticales retiene la membrana nuclear fuera de línea (fantasmas nucleares) que persisten en el eje.

Las células cuticulares migran lateralmente y emergen hacia la superficie, son más alargadas y aplastadas. Durante la queratinización de las células cuniculares gránulos trichohyalí, restos de núcleos, ribosomas y mitocondrias son movidos al lado interno del citoplasma y forman una endocutícula.

Por último las células medulares no presentan tanta actividad de síntesis como las anteriores, sus precursores son localizados más centralmente dentro del anillo concéntrico de las células germinales arriba de la papila dermal. Al igual que las otras células, al diferenciarse comienzan a desintegrarse con una evidente vacuolización del citoplasma ni bien alcanza el centro del eje del bulbo.

## **EL PELO COMO EVIDENCIA FORENSE.**

Los filamentos pilosos pueden ser transferidos durante el contacto físico y su presencia puede vincularse al sospechoso o víctima en la escena del crimen. Hay que tener en cuenta que al ser un muestra ubicua se debe tener un entrenamiento adecuado en la toma de la misma. Las muestras de pelo remitidas para estudios forenses son generalmente de la cabeza o del pubis; pueden ser transferidos ya sea por arrancamiento, por ejemplo, en la mano de la víctima por una maniobra defensiva o, por caída espontánea. La relevancia del pelo como prueba depende del vínculo de este rastro con el hecho. En algunos casos, puede brindar un aporte importante a la investigación penal.

Los pelos son siempre muestra única, se destruyen en el proceso de extracción y, por tanto la repetición de los análisis es imposible. Por ello, la eficiencia es la extracción de ADN tienen una importancia fundamental.

Los primeros en realizar la individualización de un único pelo humano fueron Higuchi y colaboradores en 1988 y desde entonces son muchos los autores que han discutido las posibilidades y dificultades de la individualización de pelos en distintos procedimientos de extracción.

Es difícil establecer una correlación entre la técnica de extracción, su eficiencia y el éxito de la tipificación, los resultados suelen ser aleatorios, incluso cuando se ha pretendido relacionar con la celularidad observada al microscopio (Schnee-Griese J, Aab S. 1992. en *Advances forensic haemogenetic*, Berlin).

Los estudios de obtención de ADN a partir de filamentos pilosos poseen una eficiencia relativamente baja.

-Moller y Brinkmann (1994) obtienen un 15% de eficiencia para el análisis de un único pelo, que aumenta hasta un 50% cuando utilizan 15 pelos del mismo individuo.

-Fernández y colaboradores (1996), reportan una eficiencia promedio del 20%, que resulta aún menor cuando realizan la extracción con chelex en lugar de proteinasa K.

-Greenhalgh y colaboradores (1996) obtienen una eficiencia del 66% en pelos tomados del individuo por arrancamiento y conservados como referencia, pero disminuye notablemente cuando analizan cabellos remitidos por la policía como evidencia de casos criminales.

Algunos autores postulan que la baja eficiencia se debe no solo a la escasez de células, sino al efecto inhibitor de las melaninas hidrosolubles que se generan durante el proceso de extracción del ADN, que forman un complejo inactivo constituido por dos moléculas de melanina y una de Taq polimerasa (Yoshii y col, 1994).

-En un relevamiento realizado por el Dr. Penacino Gustavo A. (1997) sobre pelos remitidos como evidencia forense se informa un 30% de eficiencia promedio para la recuperación de perfiles genéticos analizables a partir de este material.

La causa principal y fundamental es la baja cantidad de células nucleadas que los mismos contienen, que se encuentran localizadas casi exclusivamente en el bulbo piloso y su cubierta epidérmica. El bulbo o tejidos foliculares son las fuentes principales de ADN nuclear (Penacino G. 1994, Douglas W.Deedrick, 2000).

El bulbo de la raíz de pelo en fase anágeno, el tallo dentro del folículo, las vainas fibrosas epiteliales internas y externas de la raíz y el eje de queratina pesado emergente, son elementos que juntos o separados pueden ser adecuados para la tipificación de ADN nuclear. En contraste el resto está compuesto por queratina, una fuente pobre de ADN nuclear.

-McNevin D. y colaboradores (2005), realizaron procedimientos en común de extracción de ADN nuclear y cuantificación con PCR real time de varios donadores, se realizaron estrategias de amplificación, ciclos extendidos o rondas adicionales de PCR. Se encontró que hay ADN nuclear en el eje del pelo aunque niveles muy bajos. Se encontraron perfiles mixtos y con contaminantes lo que indica bajo número de copias (LCN). Se encontró que el lavado de los ejes pilosos disminuye la recuperación de ADN nuclear y que existe una dependencia del donante en los resultados.

-Opel y colaboradores (2008) determinaron que las cantidades de ADN que pueden ser extraídos de un pelo arrancado con raíz son de 1ng/raíz a 750ng/raíz y en pelo caído con raíz de 1ng/raíz a 10ng/raíz. En dicho estudio se extrajo el ADN de 6 pelos de cada individuo de un total de 60 individuos. La cantidad de ADN recuperado de cada individuo varía enormemente, y de la mayor parte de muestras se obtuvieron una cantidad de 550 pg o menos por pelo. El ADN también fue cuantificado en tiempo real PCR con la utilización de tres amplicones diferentes de una secuencia Alu. Los resultados fueron usados para determinar el estado de degradación del ADN extraído y las cantidades de ADN diferentes se separaron en 3 grupos (<100pg, 100-500pg,> 500pg) y fueron amplificadas con los equipos Miniplex para determinar la cantidad mínima requerida para la amplificación. El ADN recuperado del pelo mostró degradación y se obtuvieron perfiles parciales para aquellas muestras que contienen al menos 60 pg usando MiniSTRs. En muestras forenses la cantidad y calidad pueden ser significativamente afectadas por factores ambientales.

El material nuclear es degradado con el proceso de queratinización, pero el ADN mitocondrial al ser circular y covalentemente cerrado es menos susceptible a los procesos degradativos. La región control del ADN mitocondrial, es la más interesante desde el punto de vista de la Genética Forense debido a que es la región hipervariable y lo suficientemente pequeña para ser abordada por estudios con PCR y se-

cuenciación; mide aproximadamente 1.100 pb y forma parte del 10% del ADNmit no codificante.

Considerando los inconvenientes mencionados anteriormente en la obtención del ADN genómico de buena calidad a partir de muestras de bulbos pilosos y considerando los métodos de extracción de ADN descritos en este trabajo, se plantearon los objetivos de este trabajo de tesis.

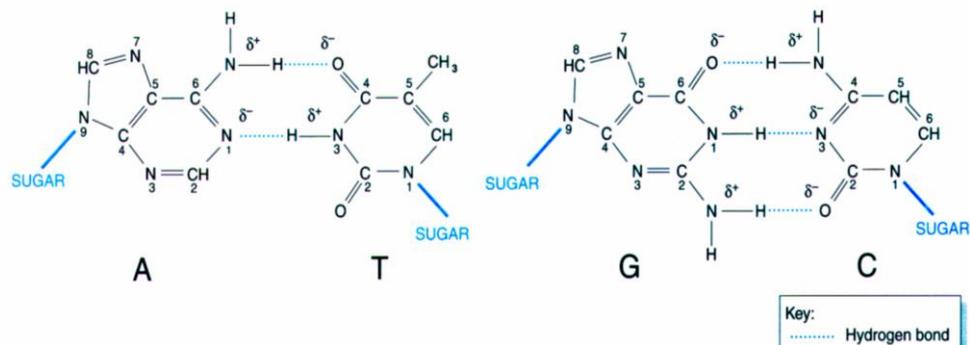
## **EL ADN CELULAR Y LOS DISTINTOS TIPOS DE SECUENCIAS EN EL GENOMA.**

La identidad química del ADN fue descubierta por Friedrich Miescher en 1871, quien publicó un método para separar el núcleo celular del citoplasma. A partir de estos núcleos extrajo un material ácido, al que denominó nucleína. Recién transcurridos más de 70 años a partir de este primer hallazgo, se identificó al ADN como portador de la información genética (Avery y colaboradores, 1944; Hershey and Chase, 1952).

En 1953, James Watson y Francis Crick dedujeron la estructura tridimensional del ADN e inmediatamente interpretaron su mecanismo de replicación. Analizaron las figuras de rayos X de fibras de ADN obtenidas por Rosalind Franklind y Maurice Wilkins y a partir de estos datos propusieron un modelo estructural esencialmente correcto, cuyas características más sobresalientes son:

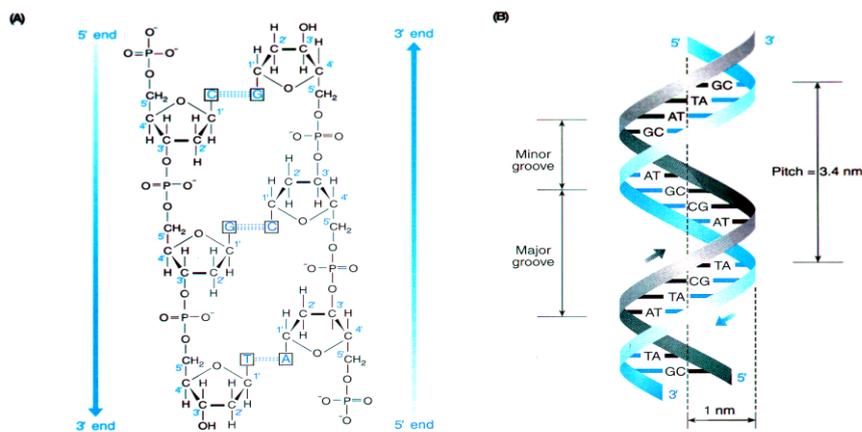
Químicamente el ADN es un biopolímero compuesto por unidades nucleotídicas conformadas por una base nitrogenada, una pentosa (desoxirribosa) y un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas son cuatro: Adenina y Guanina (púricas) y Citocina y Timina (pirimídicas), y constituyen la parte variable de la molécula (figura 3).

Figura 3: Los pares de bases A-T tienen 2 uniones de hidrógeno; y los pares de bases G-C tienen 3 uniones H



La molécula de ADN está formada por dos cadenas antiparalelas que adoptan una conformación de doble hélice. Las cadenas se hallan unidas por puentes de hidrógeno formados entre las bases complementarias. Las bases nitrogenadas se proyectan en el centro de la estructura conformando un ambiente hidrofóbico delimitado por el esqueleto fosfodiéster (figura 3).

Figura 4: La estructura del ADN es una doble cadena, hélice antiparalela.



The structure of DNA is a double-stranded, antiparallel helix.

(A) Antiparallel nature of the two DNA strands. The two strands are antiparallel because they have opposite directions for linking of 3' carbon atom to 5' carbon atom. The structure shown is a double-stranded trinucleotide whose sequence can be represented as: 5' pCpGpT-OH 3' (DNA strand on left) / 5' pApCpG-OH 3' (DNA strand on right) (where p = phosphodiester bond and -OH = terminal OH group at 3' end). This is normally abbreviated by deleting the 'p' and 'OH' symbols and giving the sequence on one strand only (e.g. the sequence could equally well be represented as 5' CGT 3' or 5' ACG 3'). (B) The double helical structure of DNA. Note that the two strands are wound round each other to form a *plectonemic* coil. The *pitch* of each helix represents the distance occupied by a single turn and accommodates 10 nucleotides in B-DNA.

En los organismos eucariontes, el ADN nuclear se encuentra altamente organizado en estructuras llamadas cromosomas. Cada molécula constituye un cromosoma y en los individuos diploides, como el hombre, las células somáticas llevan dos juegos

cromosómicos homólogos, uno heredado por vía paterna y el otro por vía materna. El genoma humano nuclear se encuentra organizado en 22 pares de cromosomas autosómicos más un par sexual, que es XX en la mujer y XY en el hombre. En el proceso de división celular por meiosis, los pares homólogos recombinan entre sí al azar, de modo que el juego haploide que recibe cada célula germinal es una combinación única de las secuencias de los dos cromosomas homólogos que le dieron origen. Los eventos sucesivos de recombinación en cada generación, hacen que no haya dos individuos genéticamente iguales (a excepción de los gemelos univitelinos). Un principio que sirve de fundamento para la identificación individual a partir del análisis de secuencias de ADN autosómicas.

Para comprender la organización de los distintos tipos de secuencias, el Proyecto Genoma ha cartografiado el mapa genético humano (Organigrama 1). De la secuenciación completa del genoma humano haploide se observó que tiene 3.200 millones de bases. El 38% de todo el genoma, unos 1200 Mb, son genes y secuencias relacionadas con genes. La expresión de los genes involucra la transcripción del ADN a Pre-ARN mensajero, el cual mediante un proceso de corte y empalme (splicing) da origen al ARN mensajero maduro, luego en el citoplasma celular el ARNmensajero codifica las proteínas. En consecuencia el porcentaje de secuencias del ADN total que codifica para proteínas es del 1.5 %. Por otro lado se encuentra las secuencias relacionadas con genes que no codifican para proteínas y se denominan pseudogenes (genes inactivados por mutaciones), fragmentos de genes (genes truncados), intrones (fragmentos de ADN que se eliminan en el proceso de splicing) y regiones terminales no traducidas, UTR, (se hallan al principio y final de los genes). También encontramos los productos ARN no codificante de proteínas que juegan varios roles en la célula (ARN de transferencia, ribosómico, nuclear, nucleolar y citoplasmáticos) (Brown TA.; Cap. 3; 2002).

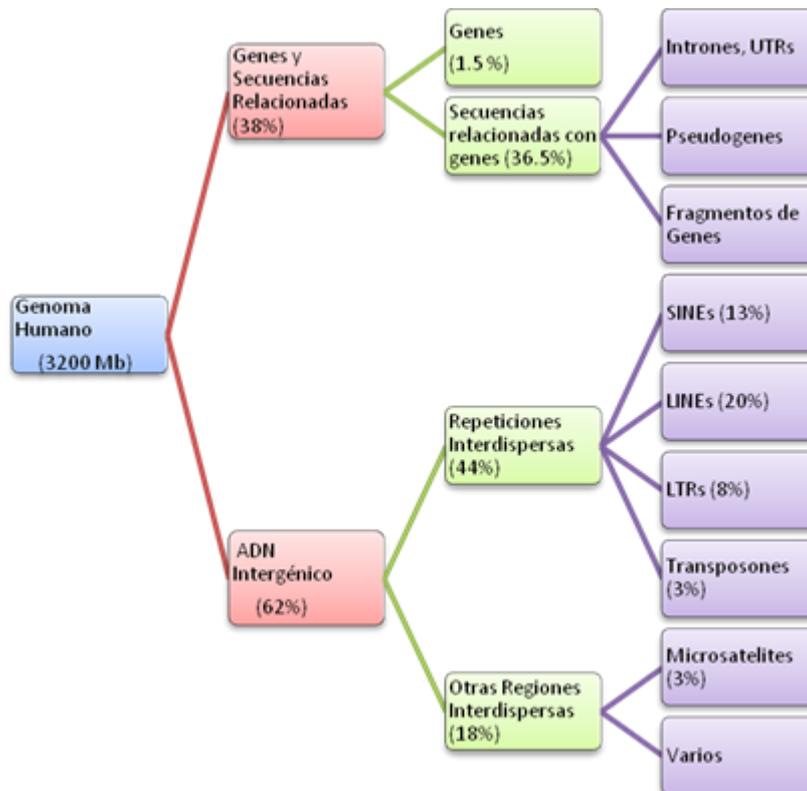
El resto de toda la secuencia del genoma humano, aproximadamente el 62% (2000 Mb), comprende regiones Intergénicas que no tienen función conocida y la mayor parte están formadas por secuencias repetidas (IHGSC, 2001; Venter y colaboradores., 2001).

Según la distribución de sus unidades repetidas en el genoma podemos distinguir dos clases de ADN repetitivo, primero en aquellas unidades repetidas que están distribuidas alrededor del genoma de una manera aparentemente aleatoria como los Elementos Nucleolares Interdispersos Cortos o secuencias SINE (Short interspersed Nucleolar Elements), los Elementos Nucleolares Interdispersos Largos o Secuencias LINE (Long interspersed Nucleolar Elements), elementos de Repeticiones Terminales Largas o LTR (Long Terminal Repeat) y Transposones, estos últimos a diferencia de las secuencias anteriores no requieren intermediarios ARN para transponerse.

En una segunda clase está el ADN repetitivo en tándem cuyas unidades de repetición se disponen una junto a la otra, ejemplos de secuencias repetidas en tandem muy abundantes en el genoma son los minisatélites y los microsatélite. El nombre minisatélites se usa para denominar aquellas secuencias en las que la unidad de repetición es de 10-100 bases, reservándose la denominación de microsatélite o STR (short tandem repeat) para aquellas secuencias en las que la unidad de bases que se repite son de unas pocas bases (2 a 7).

Como veremos más adelante, a pesar de su función desconocida, y por las facilidades que brindan para el abordaje experimental, los microsatélites se han impuesto actualmente como herramienta útil para la identificación individual.

Figura 5: Organización porcentual de los tipos de secuencia de la molécula de ADN genómico. Datos tomados de IHGSC, 2001; Venter y colaboradores., 2001



## POLIMORFISMO DEL ADN Y SU UTILIDAD EN CIENCIAS FORENSES PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Para poder estudiar los caracteres genotípicos al nivel de la molécula de ADN es necesario seleccionar secuencias específicas que se vinculen en forma directa o indirecta con la característica a estudiar. La elección de la secuencia indicadora tiene que ver con el objetivo que se persigue a través del análisis y debe estar científicamente fundamentado el porqué de la elección del sector del ADN que se analiza. Sólo para citar algunos ejemplos, podemos decir que hay marcadores para enfermedades hereditarias, para sensibilidad individual a determinados fármacos y para predisposición a enfermedades.

Cuando nos referimos a la posición o localización específica de un gen o de una secuencia indicadora en el ADN, lo denominamos locus (del Latín: lugar); y las variantes bajo las que se puede presentar esa secuencia se denominan alelos (del griego: otro de uno). Un alelo mutante surge a partir de cambios en la secuencia

original. La introgresión de un alelo mutante en una población depende de su comportamiento frente a la presión de selección (a favor, en contra o neutro) y de la frecuencia de mutación. Según la presión de selección, su frecuencia en la población puede variar. De este modo, en las poblaciones actuales, algunos locus puede presentarse bajo distintas formas alélicas, y se dice que el locus es polimórfico.

Cuando la variabilidad se relaciona con diferencias en la secuencia de bases, se habla de polimorfismos de secuencia. Es el caso de la región control del ADN mitocondrial o de los SNP (polimorfismos de un único nucleótido). En el otro extremo, tenemos el polimorfismo en los genes del complejo principal de histocompatibilidad (HLA), donde la selección natural ha favorecido la diversidad fenotípica.

.....AGACTAGACATT.....

.....AGATTAGACGTT.....

En las secuencias repetidas en tandem, la naturaleza polimórfica no está dada por su secuencia sino por el número de repeticiones de una unidad repetida.

.....(AATG) (AATG (AATG))..... 3 repeticiones

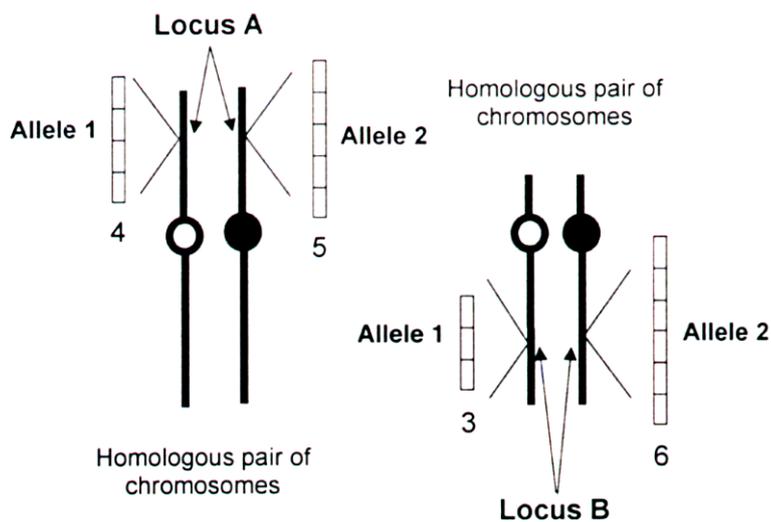
.....(AATG) (AATG)..... 2 repeticiones

Las mutaciones obedecen a cambios en el número de repeticiones y el mecanismo que las genera es diferente a los mecanismos que ocasionan las mutaciones de punto. Se acepta que la generación de mutaciones en microsatélites se deben a slippage (deslizamiento) de la ADN polimerasa sobre la región repetida de la hebra molde de ADN y el reensamblamiento en una posición más avanzada durante el proceso de replicación, favorecidos por las características repetitivas de estas secuencias (Brinkmann y cols., 1998). A consecuencia de este deslizamiento, la enzima ADN polimerasa incorpora las bases complementarias, provocando un emparejamiento erróneo entre ambas hebras de ADN. Dependiendo de que dicho error se produzca en la hebra parental o en la de nueva síntesis, el resultado es la delección o inserción

respectivamente de nuevas unidades repetitivas (Sia y cols., 1997). Estas mutaciones se dan con una frecuencia apreciable. Por esta razón, las secuencias repetidas en tandem son altamente polimórficas y las distintas variantes (alelos) bajo las que se presenta el locus difieren en el número de repeticiones. Esta variación afecta la longitud de la secuencia, razón por la cual a este tipo de polimorfismo se los clasifica como polimorfismos de longitud. En esta categoría encontramos tanto los minisatélites (VNTRs) como los microsatélites (STRs).

Uno de los sistemas más utilizados en la genética forense y que evalúan polimorfismo de longitud, fue logrado usando marcadores STR (Short Tandem Repeat) y la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta de estudio. La elevada heterocigosidad, unida al gran número de estos marcadores a lo largo del genoma, los hace extremadamente útiles para estudios de identificación humana, análisis de ligamiento en grupos familiares y prueba de paternidad. Los marcadores STRs son parte de una base de datos en crecimiento alrededor del mundo por lo cual probablemente sean los más utilizados a lo largo de muchos años.

Figura 6: herencia de marcadores STR en 2 cromosomas de un individuo ejemplo.



El cromosoma con el círculo abierto en el centrómero es de herencia paterna y el cromosoma del centrómero sólido es de herencia materna. El individuo heredó del padre un alelo de 4 repeticiones del locus A y 3 repeticiones del locus B, y de su madre heredó 5 repeticiones del alelo del locus A y 6 repeticiones del alelo del Locus B. Tomado de Butlher (2011).

Con la necesidad de obtener más información de muestras particulares, actualmente se utilizan estudios adicionales con marcadores SNPs, (single nucleotide polymorphisms). Los marcadores SNPs son variaciones entre individuos de una sola base en un punto particular en el genoma. Existen millones de SNPs por individuo que pueden ser utilizados para identificación.

Los SNPs son menos informativos que los marcadores STRs y para obtener un poder de discriminación significativo es necesario analizar un gran número de SNPs. Por ejemplo, para equiparar el poder de discriminación de los 13 loci STR del CODIS son necesarios 50 SNPs (Gill y colaboradores. 2004). Sin embargo, por sus características los SNP puede tipificarse en muestras con ADN altamente degradado. Los SNPs pueden ser multiplexados por métodos de hibridación en matrices o chips (array).

Otra forma de polimorfismo bi-alelico utilizados para identificación son las inserciones-delecciones, (INDEL), y pueden tener uno a cientos de nucleótidos en su secuencia, al igual que ocurren con inserciones en las secuencias ALU. (Pereyra, R., y colaboradores. 2009).

En el caso particular de la secuencia del cromosoma Y, no existe un cromosoma homólogo y la homología con el cromosoma X es muy limitada. Por esta razón se hereda prácticamente sin cambios a través de la línea hereditaria masculina. Cuando se analizan las secuencias del cromosoma Y con fines identificatorios, se define la identidad del linaje masculino, y no la identidad individual, de paternidad o criminalístico.

Algo similar ocurre con el ADN mitocondrial, pero en este caso, como componente del citoplasma se hereda por la matrilinea. Existen entre 1.000 a 10.000 moléculas de ADNmit por célula, superando ampliamente el complemento de dos copias del ADN

nuclear. La probabilidad de recuperar ADN mitocondrial en un material altamente degradado es mayor que la del ADN nuclear, ya que por su estructura y por su tamaño es más resistente a degradación. En este caso, su utilidad se limita a la identificación del linaje materno siendo una restricción importante para su uso como herramienta en genética forense (Butler, J.M. 2011). Otra de las limitaciones encontradas para los estudios forenses es que debido a la alta tasa de mutación, que puede generar diferencias en la secuencia de la población celular de ADNmit, característica conocida como heteroplasmia (un mismo individuo presenta más de un genotipo de ADNmit). Cuando una célula heteroplásmica se divide, la herencia mitocondrial en las células hijas es una cuestión de azar, de modo que el nivel de heteroplasmia puede no ser el mismo en diferentes tejidos. Particularmente importante en muestras de pelo (Wilson y colaboradores. 1997). No obstante estas limitaciones, en muchos casos los estudios de ADNmit han aportado información histórica relevante, como la identificación de los restos de la familia Romanov, los últimos zares Rusos ejecutados bajo las ordenes de Lenin en 1918 (padres y sus 5 hijos) y enterrados en una fosa común.

El distinto origen celular que caracteriza la composición del filamento piloso podrían llevar al menos dos tipos o poblaciones de mitocondrias, aquellas provenientes de las células de la matriz celular del bulbo de origen mesodérmico y las provenientes de los melanocitos de origen ectodérmico. En caso de heteroplasmia, es potencialmente probable encontrar distinto tipo de ADNmit a lo largo del eje del pelo o en pelos originados del mismo folículo.

## **EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LAS TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO EN CIENCIA FORENSE.**

Los sistemas para identificar personas siempre han sido un punto de interés para las Ciencias Forenses. Es de práctica habitual el estudio de caracteres fenotípicos como la fisonomía, o las huellas dactilares. Con el mismo objetivo, las pruebas biológicas han sido usadas desde hace tiempo.

En un principio se usaron pruebas bioquímicas, como el estudio de los antígenos eritrocitarios (grupos sanguíneos), de algunas proteínas plasmáticas polimórficas y de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA). Estas determinaciones

definen la identidad de grupo y no la identidad individual, por lo que su utilidad se limita a la exclusión.

En el sistema ABO sólo hay 4 posibles grupos fenotípicos principales en base a los antígenos presentes en la membrana de los eritrocitos: A, B, AB y O, por lo que su poder de exclusión es limitado. Hay muchos individuos no relacionados que comparten el mismo grupo sanguíneo. Al sistema ABO, descubierto en 1901 por Landsteiner, se fueron agregando posteriormente otros, como el RH, MNS, Duffy, Lewis, Kidd, Lutheran, etc. De esta forma se pudo aumentar el poder de discriminación de la prueba. No obstante, la probabilidad de exclusión no superaba el 75%. Si bien el poder de discriminación de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, CMH, es muy superior al de los grupos sanguíneos también en este caso queda definida la identidad de grupo.

En 1980 Wyman and White demostraron que era posible analizar la variabilidad individual sobre la base de la distinta longitud generada por una misma secuencia de ADN repetida en tándem (Wyman and White, 1980). La aplicación del análisis de ADN en Ciencia Forense se inicia en 1985 a partir de estudios realizados por el Dr. Alec Jeffrey estudiando el gen de la mioglobina. El Dr. Jeffrey propone el estudio de polimorfismos en la longitud de secuencias de ADN repetidas conocida como VNTR (variable number tandem repeat). Usando el método de Southern Blotting mediante la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, RFLP, y condiciones poco estrictas de hibridación con sondas VNTR propone el análisis global de secuencias, al procedimiento lo denominaron DNA Fingerprinting ó "huella genética" (Jeffrey y Col., 1985). Sin embargo era difícil su estandarización y automatización. Pequeñas diferencias experimentales significativas y poco controlables en la corrida electroforética (voltaje, tiempo, concentración del gel), afectan en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados. La interpretación de muestras con mezclas de genotipos es aún más compleja y se requiere de mucho tiempo, labor y experiencia. Por ello posteriormente se desarrolló un sistema que producen patrones más sencillos y fáciles de interpretar, con sondas unilocus que reconocen secuencias repetidas ubicadas en un locus único específico dentro de cromosomas homólogos, de manera que se detectan una o dos bandas (alelos) según el individuo sea homocigoto

o heterocigoto; este sondaje unilocus requiere condiciones de hibridación estrictas (Martinez J., 1999).

Con varias sondas se consigue el mismo poder de individualización que proporciona un único análisis multilocus, de esta manera el método reúne las ventajas de ambos sistemas: simplicidad de patrones y gran poder discriminativo. Sin embargo a pesar de las ventajas mencionadas estos sistemas requieren alta concentración de ADN y que no se halle degradado, por estas causas las muestras se consumen con el primer análisis dificultando las contra pericias y son bastante tediosas desde el punto de vista experimental.

Con el advenimiento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR, estas limitaciones pudieron ser superadas, por cuanto este método experimental permite seleccionar y amplificar secuencias de ADN específicas mediante ciclos repetidos de reacciones enzimáticas. Esta técnica se ha impuesto por la rapidez para la obtención de los resultados, y por la versatilidad del análisis, que permite abordar el estudio de vestigios biológicos, donde la concentración de material es muy escasa y en muchos casos se encuentra degradada. El uso de microsatélites, por su longitud, permite la amplificación de la secuencia, que se caracteriza por su diferente migración en la electroforesis.

Una variante de la técnica PCR que se ha impuesto en ciencias forenses es denominada Multiplex. Esta técnica permite que más de una región pueda ser amplificada en forma simultánea simplemente adicionando a la mezcla de reacción más de un par de cebadores (Edwards and Gibbs 1994). La obtención simultánea de información de varios loci disminuye los tiempos experimentales y la cantidad de templado necesario logrando con una única reacción de PCR alcanzar un alto poder de discriminación.

Los primeros Kits Multiplex Comerciales muy utilizados a mediados de los 90, fueron diseñados para el análisis en geles de secuenciación. Estos reactivos permitían el análisis simultáneo de 3 marcadores STRs, con un poder de discriminación de 1 en 500; 4 marcadores, con un poder de discriminación de 1 en 10.000 (Kimpton y colaboradores 1994) y seis, con un poder de discriminación de 1 en 50 millones

(Kimpton et al 1996). El limitante para el número de marcadores era la superposición en los tamaños de los amplicones.

El uso de la Electroforesis capilar como método de detección y los cebadores marcados por fluorescencia hizo posible la tipificación simultánea de un número mucho mayor de microsatélites. La utilización de distintos fluorocromos para marcar las secuencias durante la reacción de PCR permite el análisis aun cuando los fragmentos tengan longitudes semejantes, ya que los mismos pueden diferenciarse en el secuenciador automático gracias a distintas señales de fluorescencia que emiten dichos loci.

## **LOS MARCADORES MICROSATÉLITES Y LA CONSTRUCCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO.**

Los microsatélites son loci que contienen secuencias cortas (entre 2 a 7 nucleótidos) que se repiten en tándem, siendo el número de repetición el elemento diferenciador entre alelos. En el genoma humano han sido caracterizados más de 20,000 loci de STRs (Collins y colaboradores. 2003). Éstos se hallan esparcidos a lo largo del genoma y ocurren en promedio 1 de cada 10.000 nucleótidos (Edwards y colaboradores. 1991).

El número de repeticiones de la unidad puede ser altamente variable entre individuos lo que los hace efectivos para la identificación humana. La pequeña medida de los alelos STRs (aprox. 100 a 400 pb) comparado con los alelos VNTRs (aprox 400 a 1000 pb.) los hace buenos candidatos para la amplificación por PCR, facilitando el análisis de las muestras forenses donde el ADN se encuentra frecuentemente degradado. La longitud reducida de los productos de amplificación minimiza la pérdida alélica por la amplificación preferencial de los fragmentos más cortos.

Los STRs seleccionados para su uso en genética forense presentan baja tasa de mutación y se localizan en distintos cromosomas para asegurar que los loci no pertenezcan a un mismo bloque de ligamiento. De esta forma se busca garantizar un alto poder discriminativo.

De acuerdo con las recomendaciones de la Internacional Society of Forensic Haemogenetic (ISFH), la denominación de los alelos de los STRs se debe realizar de acuerdo al número de unidades de repetición (UR) de la secuencia básica. Por ejemplo para una muestra conteniendo dos alelos, uno con 13 repeticiones y otro con 18 UR, para ese locus en particular el genotipo se denomina por nomenclatura como 13,18. Para el caso que tenga una UR incompleta (Microvariante), el alelo se designa por el número de UR y el número de pares de bases de la UR incompleta, separando estos por un punto. El ejemplo más común es el alelo microvariante 9.3 del locus TH01, el cual contiene 9 repeticiones de tetranucleótidos y una repetición incompleta de 3 nucleótidos, en la séptima repetición se pierde una A de la unidad repetitiva AATG (Puers y colaboradores 1994).

Los marcadores STR se denominan de acuerdo a su localización. Si es parte de un gen o cae dentro de un gen, el nombre del gen es usado como designación, p.e el marcador TH01 es el gen tiroxina hidroxilasa localizado en el cromosoma 11. El número 01 es el hecho de que la región repetitiva en cuestión es localizada dentro del intrón 1 del gen tiroxina hidroxilasa. Los marcadores que caen fuera de regiones de genes son designados por su posición en el mapa. Por ejemplo, STR D5S818 y DYS19, en ese caso D se refiere a DNA. Las siguientes referencias son el número cromosómico, 5 en el primero, y en el segundo por cromosoma sexual Y. "S" se refiere al hecho de que el marcador es copia de secuencia simple. El número final indica el orden en que fueron descubiertos y categorizados para un cromosoma en particular.

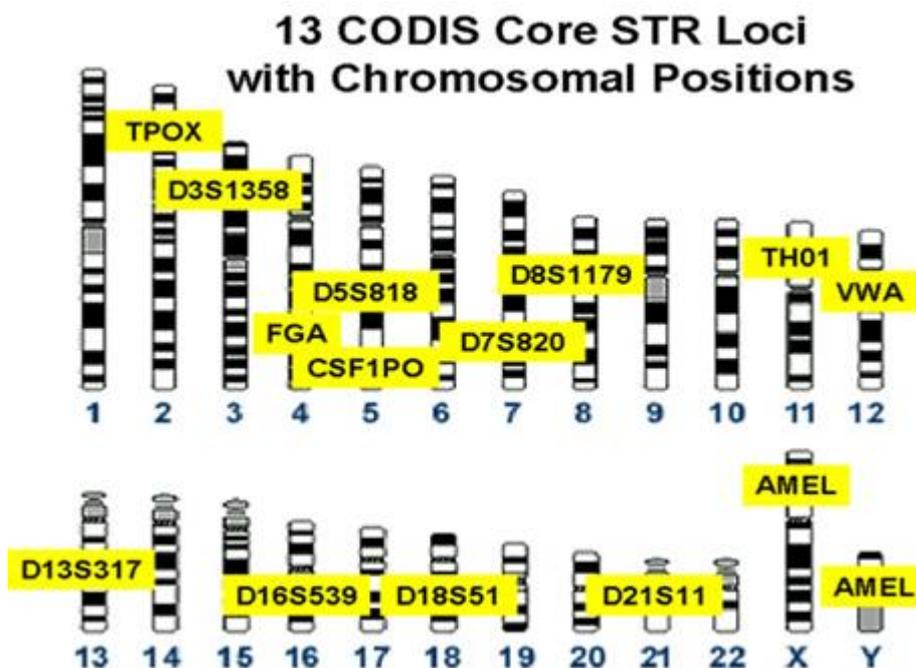
Los tetranucleótidos AGAT o GATA son los motivos más comunes para loci STR usados por la ciencia forense. Una extensión de cuatro bases logra un espaciado definido en el caso de heterocigotos y es fácil de resolver por separaciones electroforéticas basadas en medidas de longitud. Otra de las ventajas técnicas que presenta el uso de STRs con UR de 4 o más nucleótidos tiene que ver con un artefacto frecuente en la amplificación por PCR conocido como "stutter", que se produce por desplazamiento de cadena durante la reacción de polimerización (Walsh et al, 1996) y tienen típicamente una o más unidades de repetición de menos que el alelo verdadero. Cuanto más larga es la unidad de repetición, menor es la diferencia entre la concentración del stutter y el alelo STR verdadero. Para el caso de tetranucleótidos, la intensidad del pico correspondiente al stutter llega a ser

usualmente menor al 15 % de la observada en el alelo verdadero, mientras que en di- o trinucleótidos la este porcentaje puede ser mucho mayor (30% o más) haciendo dificultosa la interpretación, sobre todo en el caso de mezclas.

A comienzos de 1996 el FBI junto a varios laboratorios realizaron una selección de loci STR para la identificación individual con la finalidad de construir una base de datos nacional que se conoce actualmente como CODIS (Combined DNA Índice System). Como consecuencia de este proyecto fueron elegidos 13 marcadores STR que conforman el perfil genético básico para la identificación individual en el sistema de base de datos de EEUU (Budowle y colaboradores 1998). Con estos 13 loci, el promedio de probabilidad del perfil es de 1 en 1 billón entre individuos no relacionados (Chakraborty y colaboradores 1999).

Por su parte la comunidad Europea sugirió inicialmente un panel de 6 Marcadores para definir el perfil que fueron ampliados a 12 en las últimas recomendaciones. Algunos coinciden con los del CODIS otros no (ENFISA DNA Working Group 2011).

Figura 7: 13 loci STR con su posición cromosómica del sistema CODIS.



Con el objetivo de regular el trabajo científico en genética forense y con el ánimo de estandarizar procedimientos y establecer un riguroso control de calidad, surgieron

hace ya varios años el Scientific Working Group on DNA Analysis and Methods (SWGDM) en EEUU., y la European DNA Profiling Group (EDNAP), en Europa, con representantes de distintos países europeos.

Con los kits comerciales actualmente disponibles se puede caracterizar genéticamente una muestra partiendo de menos de 1ng de ADN. Sin embargo, la alta sensibilidad de los métodos incrementa el riesgo de contaminación por transferencia durante el levantamiento de los rastros o el procesamiento de las muestras.

Con la constante investigación para optimizar la obtención de perfiles genéticos para identificación en muestras forenses, Wiegand y Klieber en 2001 demostraron que se puede mejorar el éxito en la tipificación de ADN degradado usando cebadores rediseñados para minimizar la longitud necesaria de la secuencia que se desea amplificar, para aumentar la probabilidad de lograr una amplificación exitosa cuando el ADN de la muestra se encuentra muy fragmentado (Wiegand and Klieber, 2001). El rediseño consistió en minimizar la longitud de las secuencias que flanquean a la secuencia de repetición STR de interés. Applied Biosystem validó 8 marcadores miniSTRs más el marcador de género amelogenina en un kit de simple amplificación MiniFiler kit (Mulero et al., 2008).

Actualmente se están analizando las guías para la reglamentación del trabajo con muestras con Bajos Niveles de ADN o bajo número de copias, (menos de 100 o 200pg). Muchos laboratorios han establecido un umbral para el análisis en niveles de menos de 100 pg, el equivalente a 15 células diploides (Gill y colaboradores, 2000), otros determinaron 200pg o 30 células diploides (Caddy et al, 2008; Budowle et al, 2009). Sin embargo, aun no hay una línea rígida de división entre la metodología a aplicar para estas muestras y la tipificación STR convencional (Gill & Buckleton, 2010). Para obtener perfiles a partir de estas muestras limitadas, se han propuesto variantes de los métodos de tipificación convencionales. Tales como volumen reducido en la reacción de PCR y aumento de la cantidad de taq, ciclos de amplificación adicional, purificación post amplificación de los fragmentos obtenidos o incremento del voltaje o del tiempo de inyección en la electroforesis capilar. Sin embargo, en la búsqueda de aumentar la sensibilidad de los métodos experimentales pueden

incrementarse., los efectos estocásticos tales como la pérdida alélica o picos extras entre otros.

Como referencia sabemos que la mayoría de los kits comerciales de tipificación STR trabajan bien con una cantidad de templados de 1 ng. Una célula conteniendo una simple copia diploide del genoma humano tiene aproximadamente 6 pg o 0.006 ng.de ADN genómico. Una cantidad de 1 ng de ADN genómico corresponde a aproximadamente 333 copias de cada locus ( $1\text{ng} \cdot 2\text{copias}/0.006\text{ng}$ ) que puede ser amplificado. Así un rango típico de cantidad de ADN de 0.1 ng a 25 ng podría involucrar aproximadamente 30-8330 copias de cada secuencia de ADN. Para ilustrar las magnitudes de las concentraciones de trabajo se puede decir que la cantidad de ADN templado en una gota de sangre o aproximadamente 10 microlitros, contiene aproximadamente 70.000 a 80.000 células blancas sanguíneas (alrededor de 500 ng de ADN genómico).

#### **ANÁLISIS DEL GENOTIPO STR POR ELECTROFORESIS CAPILAR.**

Luego de ser amplificados, los fragmentos marcados pueden ser separados y detectados por electroforesis capilar en un secuenciador automático. La intensidad de la emisión es reportada en unidades arbitrarias tales como unidades relativas de fluorescencia, RFUs, que se refleja en forma gráfica como el área de los picos en un electroferograma.

El sistema de electroforesis capilar permite aplicar un voltaje alto ya que al tener los capilares un área de superficie grande se logra la disipación del calor que genera el movimiento de los iones en un campo eléctrico. El campo eléctrico que se aplica es mayor que la electroforesis en láminas de gel, 300 V/cm en lugar de los 10 V/cm que se usa en la electroforesis capilar, lo que hace la corrida mucho más veloz. Puede usarse cantidades mínimas de muestras y permitiendo retestearse si fuera necesario; esto es importante en ciencia forense ya que a menudo la muestra no puede ser reemplazada.

La inyección, separación y los pasos de detección pueden ser automatizados permitiendo la corrida de múltiples muestras. Los sistemas automáticos tienen ventajas con respecto a los sistemas manuales. Al utilizar distintos fluorocromos en los

extremos 5" de los cebadores permite el análisis simultáneo de los distintos loci incluso cuando estos tengan alelos con tamaños solapantes, ya que los mismos pueden diferenciarse en base a distintas señales de fluorescencia que emiten dichos loci.

El equipo secuenciador funciona de forma automática inyectando las muestras (que se preparan igual que durante la secuenciación en geles) y se colocan en una placa de 96 pocillos, en un capilar previamente cargado con la solución de un polímero viscoso denominado Polymer Optimized Poliacrylamide, (POP). El polímero sirve como medio tamizante y permite resolver fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada del capilar el láser de argón iónico detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN fluorescente y traduce esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente. Una vez desarrollada la electroforesis de la primera muestra el capilar se vacía relleniéndose nuevamente con polímero y se vuelve a inyectar una segunda muestra, y así sucesivamente.

Los picos del electroferograma representan fragmentos de ADN identificados asociados con un color. Estos fragmentos son medidos por comparación con una medida estándar interno que se adiciona a la muestra en un canal de color diferente al de los STRS. Un ejemplo lo constituye el GS500-ROX, que contiene 16 fragmentos con un rango de medida desde 35 pb a 500 pb marcado con el tinte ROX (emite en el rojo). El estándar interno de movilidad permite medir de manera automática el tamaño de los alelos eliminando las diferencias de movilidad electroforética que pueden existir en las diferentes calles de un gel.

Figura 8: Inyección, separación y detección en Electroforesis Capilar

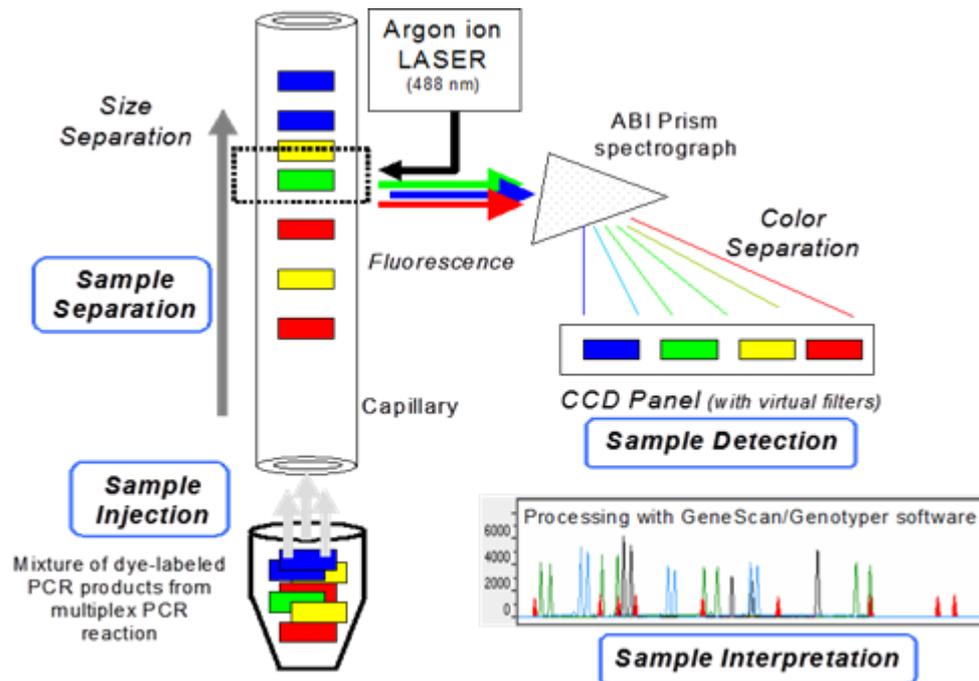


Fig. Tomada de J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2<sup>nd</sup> Edition © 2005 Elsevier Academic Press

Históricamente, el análisis de los datos colectados por el secuenciados se analizaban con dos softwares: GeneScan y Genotyper (PE Applied Biosystem) para realizar una tipificación automática del perfil del ADN multilocus obtenido en cada muestra. El GeneScan era usado para resolver la medida de los fragmentos de cada una de las muestras. El electroferograma resultante era analizado el Genotyper para la identificación alélica. Esta identificación era realizada por comparación del tamaño de los amplicones con los correspondientes a las escaleras alélicas (Ladders), que contenían los fragmentos más frecuentes en la población para cada locus.

Nuevas tecnologías y sistemas de automatización se hallan continuamente en desarrollo. Actualmente se utilizan sistemas expertos para la interpretación de los datos STR. Applied Biosystem ha desarrollado el software GeneMapper ID que incluye un control de calidad en la colección de datos con secuenciadores ABI seguido de una validación del perfil del ADN de muestras que cuando pasan “luz verde” determina perfiles de ADN que no requieren una supervisión manual. Este sistema

está diseñado para trasladar la señal del electroferograma a un genotipado compatible con una base de datos. (Applied Biosystems, 2003)(Frappier, R. y colaboradores., 2008).

## **IDENTIFICACIÓN DEL RASTRO BIOLÓGICO A PARTIR DEL GENOTIPO STR.**

Para realizar la identificación individual de una muestra se realiza la comparación del perfil obtenido con una muestra de referencia, la que corresponde a un individuo previamente identificado. Si los perfiles son diferentes se puede inferir que no corresponde al mismo individuo (exclusión). Cuando los perfiles coinciden existen dos explicaciones posibles, la primera es que la coincidencia se da porque el rastro corresponde al individuo, otra explicación posible es que el rastro corresponda a otro individuo que presente el mismo genotipo STR y que la coincidencia sea fruto del azar. Es por esta razón que es necesario ponderar el valor de las observaciones teniendo en cuenta la probabilidad de los resultados, bajo cada una de las hipótesis. Si la hipótesis alternativa es que el perfil corresponde a otro individuo no relacionado genéticamente (Random man), se calcula la probabilidad del perfil en la población de referencia (colección de perfiles de ADN obtenidos de individuos no relacionados entre si y que pertenecen al mismo grupo étnico).

La probabilidad de que dos individuos no relacionados tengan diferentes genotipos aumenta conforme aumenta el número de marcadores analizados. Si existe independencia entre los loci estudiados para componer el perfil, el cálculo de la frecuencia del perfil de ADN puede realizarse multiplicando los genotipos observados en cada loci (regla del producto).

Cuanto mayor sea el número de alelos de un marcador particular, mayor será el número de combinaciones genotípicas posibles. Si hay  $n$  alelos, se pueden presentar  $n$  genotipos homocigotos y  $n(n - 1)/2$  heterocigotos. Así, un locus con diez posibles alelos podría exhibir 10 homocigotas diferentes (uno para cada alelo) y 55 combinaciones genotípicas heterocigotas. Haciendo una proyección, se puede estimar que para el análisis de 10 loci con 10 alelos cada, sería esperable  $2.5 \times 10^{17}$  posibles genotipos  $(55)^{10}$  (Butler J.M., 2010).

Las muestras forenses pueden presentar distintos grados de degradación del ADN por procesos oxidativos, bioquímicos o de contaminación con contaminantes ambientales que pueden afectar o incluso inhibir la tipificación por PCR. Cuando el ADN recuperado se encuentra degradado o en baja concentración, pueden observarse “efectos estocásticos” (azarosos), que son el resultado de muestreos desiguales en la reacción de PCR de los dos alelos presentes en un individuo heterocigoto (Walsh y colaboradores. 1992). Como consecuencia puede resultar un falso homocigoto (si uno de los alelos falla en ser detectado) o un hetericigoto desbalanceado. El efecto puede afectar a ambos alelos de un locus STR (locus dropout) obteniéndose un perfil incompleto o parcial.

Los resultados experimentales indican que con 17 a 20 copias de ADN diploide en la mezcla de reacción, ya es posible observar pérdida alélica (Fregeau y Fournier 1993, Kimpton y colaboradores. 1994). Esto permite concluir que se requieren un mínimo de 20 más copias de ADN por reacción para obtener resultados óptimos (Walsh y colaboradores. 1992).

## MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA EL ANÁLISIS FORENSE.

En general, los métodos de digestión de muestras biológicas suelen hacer uso de detergentes, para solubilizar componentes celulares, y de enzimas proteolíticas, para digerir, principalmente histonas, que de otra forma permanecerían fuertemente ligadas al ADN, dificultando su extracción. Todas las muestras deben ser cuidadosamente manejadas para evitar la contaminación o la mezcla con ADN foráneo.

Tabla 1: Cantidades de ADN extraídas de muestras biológicas

Tipo de Muestra	Cantidad de ADN
Sangre líquida	20000ng/ml a 40000ng/ml
Mancha de sangre	250 ng/cm <sup>2</sup> a 500ng/cm <sup>2</sup>
Semen líquido	150000ng/ml a 300000ng/ml
Hisopo Vaginal postcoital	10ng/hisopo a 3000ng/hisopó
Pelo arrancado con raíz	1ng/raíz a750ng/raíz
Pelo caído con raíz	1ng/raíz a10 ng/raíz
Saliva	1000ng/ml a 10000ng/ml

hisopo bucal	100 ng/ml a 1500ng/ml
Orina	1ng/ml a 20ng/ml
Hueso	3ng/mg a 10ng/mg
Tejido	50ng/mg a 500ng/mg

---

La cantidad de ADN presente en los vestigios biológicos depende de cada muestra en particular. Estas cantidades pueden variar según la cantidad de células presentes y/o la eficiencia del proceso de extracción. Las cantidades típicas de ADN extraídos de varios materiales biológicos son variables según las muestras (tabla).

Tanto la cantidad como la calidad recuperada pueden ser significativamente afectadas por factores ambientales. (Lee & Ladd, 2001)

Los métodos de extracción presentan variaciones condicionadas por el material de partida. Por ejemplo una mancha de sangre debe ser tratada diferente que una los fragmentos de huesos o los filamentos pilosos. Las diferencias en general tienen que ver con las condiciones de digestión.

### **Extracción orgánica.**

El método más clásico para la extracción de ADN, es conocido como extracción orgánica. Este método comprende tres etapas. En la primera etapa se realiza la digestión con una enzima proteolítica en presencia de detergentes, para romper las paredes celulares y desnaturalizar las proteínas que protegen el ADN. Una vez digerida la muestra los componentes celulares del digesto se separan con una mezcla de fenol/cloroformo. Las proteínas y los lípidos, por sus características de solubilidad, bandean en la interface acuoso- orgánica y el ADN, por su carga, queda suspendido en la fase acuosa, lo que facilita la separación. Se completa el procedimiento con una precipitación del ADN con etanol, el lavado y la resuspensión en agua. Algunos protocolos incluyen el uso columnas de diálisis como Centricón 100 (Amicon, Beverly, MA) para permitir la purificación y la concentración del ADN obtenido.

La extracción orgánica tiene como desventaja, además del tiempo requerido y el uso de químicos, las varias transferencias entre múltiples tubos (aumentan el riesgo de contaminación y de errores de rotulado).

### **Extracción con Chelex.**

El Chelex\* 100 (laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA) es una resina de intercambio iónico que se adiciona como una suspensión a las muestras (Walsh y colaboradores, 1991); se halla compuesto por copolímeros de styrene divinylbenzene conteniendo iones iminodiacetato emparejados. Estas resinas actúan como grupos quelantes; ligan iones metales polivalentes como el magnesio (Butler, 2010), los cuales podrían causar daño sobre el ADN a altas temperaturas. Si se hierva el ADN en presencia de estas resinas quelantes se puede evitar su degradación.

En la mayoría de los protocolos las muestras biológicas tales como manchas de sangre, se les adiciona un 5% de suspensión Chelex y se hierva por varios minutos para disgregar las células y desprender el ADN con variaciones de tiempo y temperatura de incubación, así como de la presencia o no de proteinasa K y agentes reductores como el ditioneitol (DTT), en función del tipo de muestra. Los pasos previos de lavado son de ayuda para remover posibles contaminantes e inhibidores como el grupo hemo y otras proteínas (Willard y colaboradores, 1998). La exposición a 100°C desnatura el ADN, rompe las membranas celulares y destruye proteínas celulares. Luego con un rápido spin en centrifuga precipita la resina y el sobrenadante es removido, el cual puede adicionarse directamente a la PCR.

El método es rápido, simple y no implica el uso de reactivos tóxicos, por otra parte se utiliza un solo tubo para la extracción del ADN. Como se trabaja con un extracto celular total en condiciones alcalinas la muestra contiene toda la carga de inhibidores y se obtiene el ADN desnaturado lo que invalida su uso para el análisis posterior por RFLP, sin embargo es de utilidad cuando se usa técnicas con PCR.

### **Resinas Magnéticas.**

En el método de extracción con resinas magnéticas se utiliza para concentrar y purificar el ADN. Perlas magnéticas recubiertas con sílica modificada se usan como

soporte sólido. El ADN liberado de la célula, en un ambiente caotrópico (aportado por el tiocianato de guanidinio), se une a las perlas por interacción con la sílica. La resina con el ADN adsorbido puede ser aislada de la solución usando soportes magnéticos. De esta forma es posible realizar los lavados de purificación, minimizando la pérdida de material genético. La variación en la fuerza iónica del medio permite la recuperación del ADN en el buffer de elusión. Algunas muestras, como tejidos y pelos requieren una pre-digestión con proteinasa K para asegurar la lisis y disgregar las proteínas que pueden competir con las moléculas de ADN por los sitios de unión a las resinas.

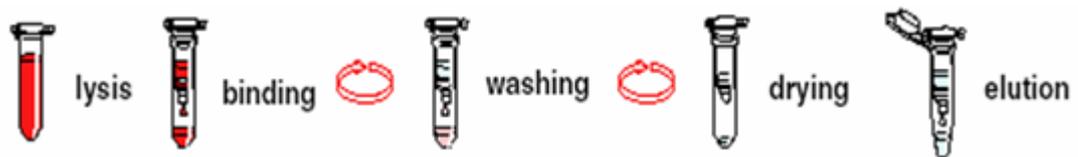
El método de Resinas Magnéticas es un sistema diseñado para purificar pequeñas cantidades de ADN y llega a ser más eficiente con muestras que contienen menos de 10 ng.

### **Columnas de Purificación.**

En 1990 Boom R. y colaboradores, desarrollaron un protocolo simple, rápido, y, adecuado para la purificación a pequeña escala de ADN y ARN a partir de suero humano y orina. El método está basado en las propiedades combinadas de lisis celular e inactivación de las nucleasas por parte de sales caotropicas como el tiocianato de guanidinio (GuSCN), con la capacidad de unión del ADN a partículas de sílice o polvo de diatomeas en presencia de este agente. La técnica de Boom R. consistió en que una muestra pequeña de suero, orina o bacterias fue pipeteada en un tubo de reacción conteniendo un carrier sólido de ADN (partículas de sílice fraccionadas o diatomeas) y un buffer de lisis conteniendo GuSCN. Bajo las condiciones creadas por las sales caotropicas el ADN se liga y forma complejos que pueden ser sedimentados por centrifugación. Estos complejos son lavados dos veces con 2 buffer etanolicos conteniendo GuSCN, dos veces con etanol al 70%, y una vez con acetona, luego son secados por centrifugación y el ácido nucleico es eluído en un buffer acuoso con concentración baja de sal. A partir de los fundamentos de estos experimentos se desarrollan los sistemas de columnas de purificación. (Volgeistein & Gillespie 1979, Boom y colaboradores 1990, Duncan y colaboradores.2003).

En condiciones nativas el ácido nucleico está recubierto de una capa hidratante de moléculas de agua que mantiene la solubilidad del ADN en agua. Con la adición de iones caotrópicos se destruye esta estructura ordenada de moléculas de agua de la capa hidratante y se crea un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. Bajo estas condiciones los ácidos nucleicos se unen a la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, metabolitos y otros contaminantes no se unen y son eliminados en los pasos de lavado. Posteriormente los ácidos nucleicos purificados se eluyen mediante tampones de elusión con baja concentración o ligeramente alcalinos ya que permite recuperar la capa hidratante liberándolos así de la membrana de sílica.

Figura 9: Extracción con columnas



Con este método no se produce ningún efecto sobre la molécula de ADN ya que la unión intramolecular de los mismos no es de naturaleza hidrofóbica. (Tereba y colaboradores, 2004).

El buffer de elusión debe equilibrarse a temperatura ambiente o para mejores resultados incubarlo a 65o C antes de colocarlo en la columna. Este ADN es directamente usado para PCR y muchas otras aplicaciones posteriores. Existen variaciones comerciales de las columnas purificación denominados Minicolumnas y Microcolumnas según el diámetro de la membrana que adsorbe el ADN.

El Kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN contiene Proteinasa K, la cual es la enzima de elección para buffer de lisis que contienen SDS usado en protocolos para tejidos, sangre y otros fluidos corporales.

El método por columnas de purificación está diseñado de manera que evita la contaminación muestra-muestra y permite un manejo seguro de muestras potencialmente infecciosas.

### Tarjetas FTATM.

Una nueva aproximación de extracción de ADN involucra el uso de papeles de filtro especialmente tratados FTATM (Burgoyne y colaboradores.1994). Las tarjetas FTATM es absorbente basado en celulosa que contiene cuatro sustancias químicas que protegen las moléculas de ADN de la degradación de las nucleasas y preserva el paper de crecimiento bacterial. Como resultado ADN en papeles FTATM es estable a temperatura ambiente por periodos de varios años.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la relación entre la prueba del perfil de ADN y el pelo como muestra forense sobre las remitidas al Laboratorio Forense de Análisis Comparativo de ADN de la Suprema Corte de Justicia de la Provincia de Buenos Aires durante el periodo del año 2013 al 2021.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

Determinar las características biológicas particulares del pelo y su relación con la eficiencia en la obtención de perfiles de ADN del pelo.

Analizar los métodos de recolección de la toma de esta muestra en particular.

## **MATERIAL Y METODOS.**

Se realizó una búsqueda documental sobre registros relacionados con estas muestras y estudios forenses, desde el levantamiento, laboratorios y valoración como prueba forense.

Se analizaron las variables de la muestra y los perfiles de ADN para comprender y comparar su relación mediante un estudio que se realizó sobre un muestreo de 255 filamentos pilosos arrancados y caídos.

Se realizó una descripción comprensiva de las dificultades de la muestra y cuál es su tratamiento en un laboratorio forense. A diferencia de otros tejidos, para realizar pruebas en laboratorio, el pelo tiene características particulares: no puede subdividirse, presenta un crecimiento cíclico y asincrónico, por estas razones y con la necesidad de uniformar la muestra, para fines comparativos en la eficiencia en la recuperación del ADN, se realizó una selección preliminar, con microscopía óptica, realizando una medición de los bulbos pilosos que posteriormente fueron utilizados en la extracción de ADN. Se aplicaron diferentes métodos de extracción de ADN, para evaluar la eficiencia en la recuperación y en la obtención de perfiles de ADN. Se utilizó

la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el Secuenciador Automático para el análisis de los marcadores obtenidos.

Se analizaron los datos obtenidos mediante estudios estadísticos para comprender la relación en las variables y evaluar junto a lo observado su significado que podría aportar criterios en los procedimientos forenses.

### **Recepción, variables y selección de muestras para su procesamiento.**

En el trabajo de referencia se realizó un muestreo controlado unificando las variables que pueden afectar el rendimiento de la extracción y obtención de perfil.

Se colectaron muestras de filamentos pilosos correspondientes a un único donante voluntario de sexo femenino obtenidos por caída espontánea y por arrancamiento. Los filamentos pilosos de caída espontánea fueron levantados en forma individual, realizando la búsqueda en distintos lugares como prendas de vestir, toallas, ropa de cama y objetos personales (peine, jabón, etc.), siguiendo las normas de levantamiento de rastros sugeridas por el Laboratorio.

Para caracterizar la población muestral se realizó la medición del ancho y el largo de los bulbos pilosos, usando para ello la imagen obtenida en una pantalla graduada de un videoscopio con una lupa de 60 magnificaciones (60x). Estos parámetros fueron usados para lograr una selección de muestras lo más uniforme posible, desde el punto de vista morfológico.

Con este objetivo se registraron las mediciones de 130 bulbos de filamentos pilosos por caída espontánea y 115 filamentos pilosos por arrancamiento. Los datos obtenidos en las mediciones se analizaron en Histogramas y gráficos de Dispersión, focalizados en la distribución de los valores, evaluados mediante cálculo de descriptivos estadísticos, distribución de frecuencias y correlaciones de las variables. Se utilizaron herramientas de cálculos manuales, Microsoft Excel y a través del software estadístico SPSS 11.0.1 para Windows Versión Estándar.

Para minimizar las variables entre las muestras utilizadas para evaluar los métodos de extracción de ADN, se seleccionó bulbos pilosos morfológicamente uniformes y cuyas medidas se hallen en mayor frecuencia dentro de la población muestral.

### **Extracción de ADN, cuantificación y genotipado de ADN.**

Existen diferentes métodos de extracción de ADN, columnas de purificación y resinas magnéticas en los cuales se comparó la cantidad de ADN obtenido y la recuperación de ADN y los perfiles (completo o incompleto) una vez extraído el ADN se amplifica mediante la técnica de PCR. Para el análisis de los fragmentos obtenidos mediante PCR se corre en el secuenciador de electroforesis capilar. Se utiliza un software para analizar el tamaño de los fragmentos (genscan) y los genotipos son asignados mediante otro software que identifica cada alelo. (genotyper)

### **Análisis de los perfiles obtenidos.**

Los picos observados en los electroferogramas se analizaron en forma comparativa, teniendo en cuenta la intensidad de los mismos medida en escala arbitraria de fluorescencia (rfu). Las comparaciones se realizaron en tres niveles: 1) Entre los Métodos de Extracción, 2) Entre las muestras de cada grupo y 3) Entre los diferentes marcadores de cada muestra. Se utilizaron herramientas de análisis como el programa Microsoft Excel y software estadístico SPSS 12.0.1 para Windows Versión Estándar.

## RESULTADOS.

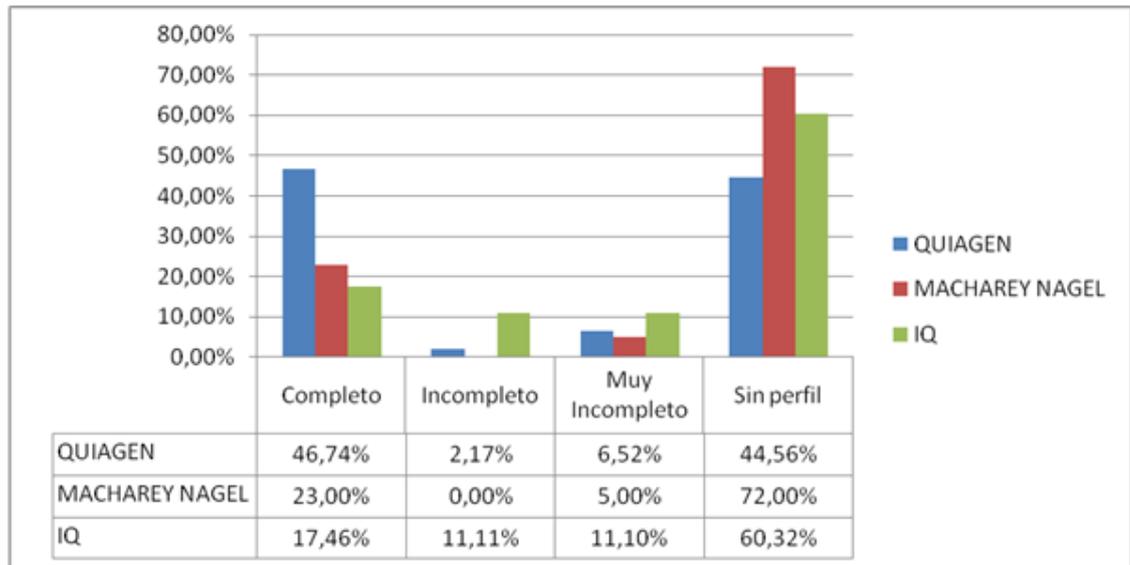
Se analizaron los resultados obtenidos en 255 extracciones de ADN de filamentos pilosos correspondientes a los casos de rutina forenses. Los mismos se agruparon de acuerdo al método de extracción utilizado y la calidad de los perfiles obtenidos (Tabla 2). De esta forma se definieron cuatro grupos, denominados: Perfil completo (todos los marcadores STRs detectados); Perfil Incompleto (más de 4 marcadores STRs detectados); Perfil muy incompleto (tres o menos marcadores STRs detectados); Sin perfil (ningún marcador STRs detectado).

Tabla 2: Comparación de los Métodos de extracción de ADN con la eficiencia obtenida de los perfiles genéticos

Métodos	Perfil Genético Obtenido				TOTAL
	Completo	Incompleto	Muy Incompleto	Sin perfil	
Macharey Nagel	23	5	0	72	100
Quiagen	43	2	6	41	92
Resinas IQ	11	7	7	38	63
TOTAL	77	14	13	151	255

Siendo el parámetro de eficiencia la obtención de un perfil completo, en el relevamiento de estas muestras se observó una diferencia significativa entre las dos marcas de columnas de purificación, con una eficiencia muy superior para el DNA MiniKit Quiagen que presenta un 46.7% de resultado efectivos contra un 23% registrado para la marca Macharey Nagel. En el caso de las Resinas Magnéticas, se analizaron 63 resultados con una eficiencia del 17.5% para la obtención del perfil completo (Histograma 1).

Histograma 1. Porcentajes de la eficiencia obtenida respecto a los perfiles genéticos tipificados con métodos de extracción de ADN ensayado.



Las muestras analizadas corresponden a casos forenses de rutina en el laboratorio. Por esta razón en las poblaciones comparadas existen variables no controladas que pueden influir en los resultados: números de bulbos procesados, estadios de crecimiento, procedencia o factor individual, contaminación con fluidos corporales, condiciones ambientales de exposición, acondicionamiento de las muestras para el envío al laboratorio ó soportes (clases de embalajes, cintas autoadhesivas). Las variaciones antes mencionadas si bien se presentan en todos los grupos en forma azarosa, podrían estar sesgando los resultados del análisis, a pesar de que la cantidad de casos analizados es alta. Por estas razones se diseñó un análisis exhaustivo para minimizar las variables mencionadas y lograr uniformidad de las muestras seleccionadas para la extracción de ADN y obtención del perfil.

### ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

El procedimiento utilizado para la extracción de las muestras permitió la clasificación en 2 grandes grupos: filamentos pilosos arrancados de la cabeza y filamentos pilosos caídos espontáneamente. Dentro del grupo de pelos arrancados encontramos diferentes estadios de crecimiento como también la presencia de células epiteliales en el arrastre mecánico de la extracción.

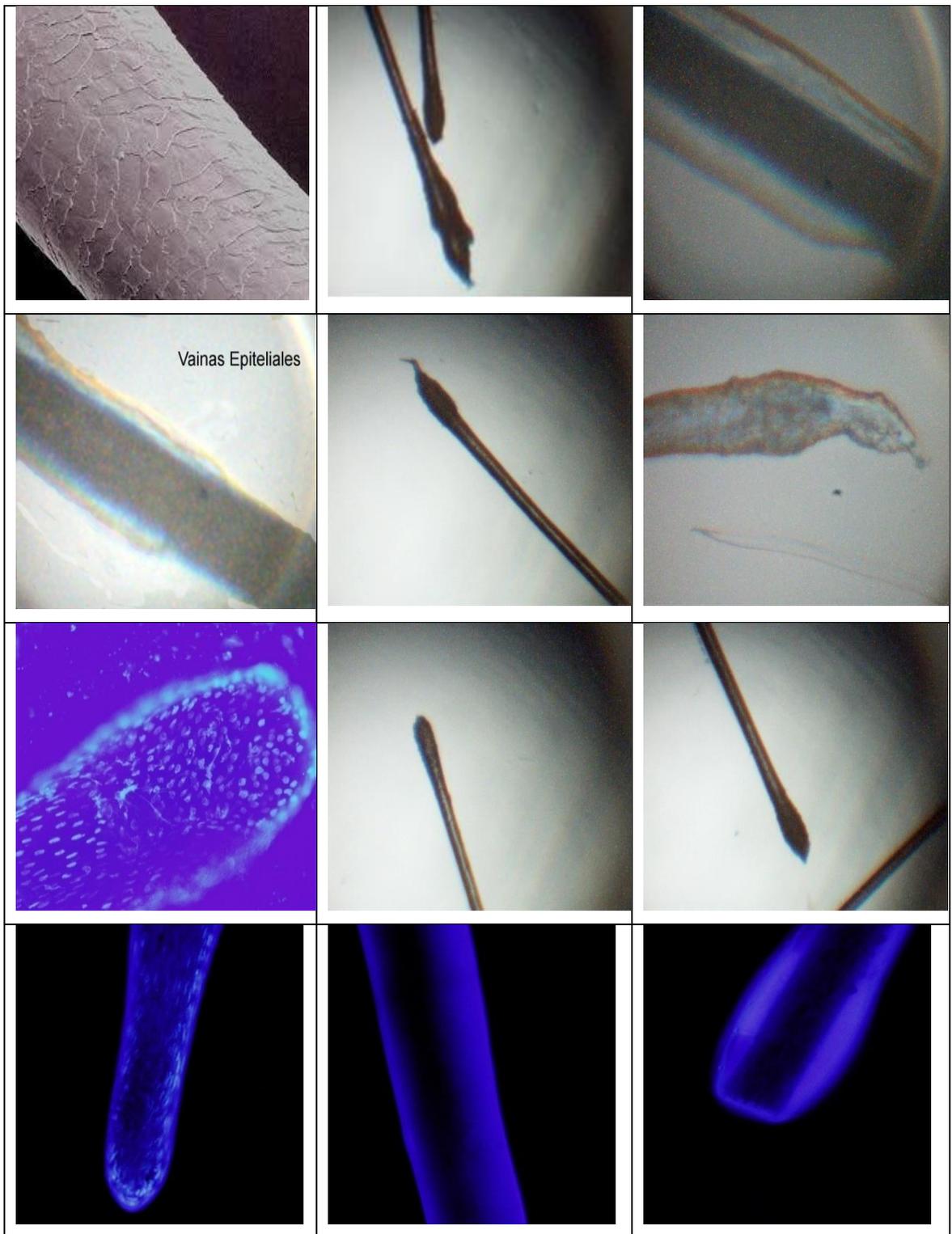
La cutícula del filamento piloso consiste en células delgadas dispuestas a manera de escamas interdigitadas cuyos bordes libres se contraponen y solapan con los bordes libres de células similares que se disponen en sentido contrario y recubren la vaina radicular externa (imagen 1), como consecuencia de esta disposición se genera una resistencia al arranque pudiendo arrastrar células epiteliales circundantes al bulbo piloso. La cantidad de células arrastradas en el arranque de un filamento piloso es una variable no controlable.

En las Imágenes podemos ver ejemplos de bulbos pilosos arrancados en diferentes estadios de crecimiento. Observamos ejemplos de bulbos pilosos en estadios anagénico y telogénico. El bulbo anagénico se reduce  $\frac{1}{3}$  comparada con la de la fase telogénica (Imagen 2).

Los bulbos pilosos pueden presentar restos de células de las vainas epiteliales circundantes (Imagen 3), ó tener adherido al mismo una prolongación que puede corresponderse al brote folicular proanágno, este brote es una zona germinal del nuevo bulbo (Imagen 4). Muestras con brotes pro anagénicos o con presencia de vainas radiculares evidentes fueron desestimadas para las pruebas ya que pueden ser bulbos exitosamente tipificados gracias a la presencia de estas estructuras extras variables.

Por sus características el bulbo del pelo arrancado es en general rico en ADN y no presenta dificultades para extracción. Esto se demuestra claramente cuando se hace la tinción con el colorante DAPI y se observa que el bulbo arrancado presenta gran cantidad de núcleos (Imagen 5).

Por el contrario un filamento caído espontáneamente, en general, se relaciona en forma directa con el estadio de crecimiento avanzado (telogénico) (Imagen 6), por esta razón la población muestral es más homogénea en relación al estadio de crecimiento. Las imágenes de los bulbos pilosos de caída espontánea con DAPI son muy variables y con escasa a ninguna presencia de núcleos (Imagen 7).



Bourguignon Luc y colaboradores (2008), proponen estimar el número nuclear en bulbos de pelos telogénicos por tinción con DAPI, el cual no interfiere en los análisis subsecuentes con PCR. De acuerdo al relevamiento realizado concluyeron que el éxito en la tipificación se halla positivamente correlacionado con el número de núcleos.

Como la morfología del bulbo piloso sufre modificaciones a lo largo de su crecimiento y uno de los cambios visibles al microscopio óptico es el tamaño del mismo, se usaron variables como el ancho y el largo de los bulbos. Para ello se midieron el ancho y largo en milímetro de 115 bulbos de pelos arrancados en una pantalla de videoscopio con aumento 60x.

Se seleccionaron 15 bulbos de igual medida para someterlas a la extracción con los tres métodos, esto es en pelos arrancados.

Se midieron 130 bulbos de pelos caídos de los cuales se seleccionaron 30 de medida similar. Las características morfométricas de las muestras de pelo caído se encuentran directamente relacionadas con el estadio de crecimiento telogénico. A dicho estadio le sucede la caída espontánea, por esta razón la población es más homogénea que la que se observa en muestras de pelo arrancadas. Las curvas del ancho y largo en muestras de bulbos de pelos caídos muestran una distribución normal.

El bulbo piloso en estadio Telogénico presenta condiciones desfavorables para la obtención de perfiles genéticos, ya que dado el estadio avanzado de crecimiento es de esperar que tengan bajo contenido de ADN y que el mismo se encuentre degradado.

Se seleccionaron muestras con los valores más frecuentes y que se hallen dentro de los valores medios de la distribución.

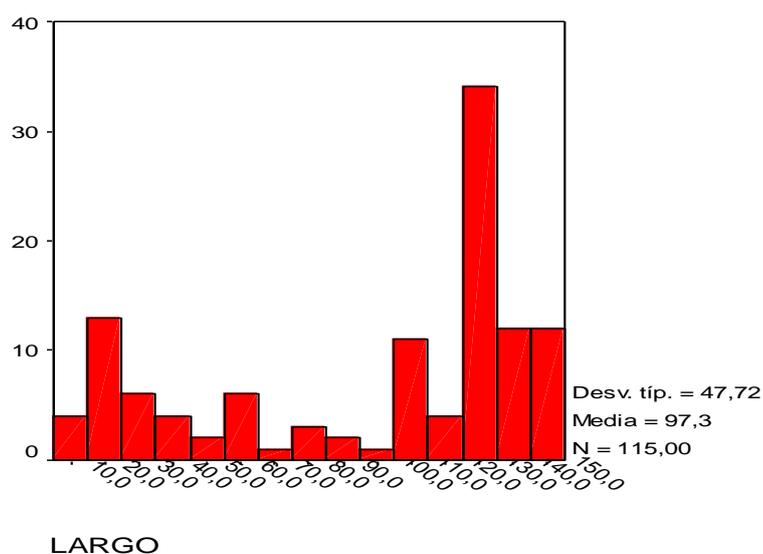
### **COMPARACIÓN MORFOLOGICA DE DOS POBLACIONES EN ESTUDIO.**

El estadio avanzado de crecimiento es la causa que provoca la caída espontánea, causa por la cual dicha población muestral es en su mayoría telogénica. Distinto es el caso en las muestras de bulbos arrancados donde se hallan representados todos los estadios de crecimiento.

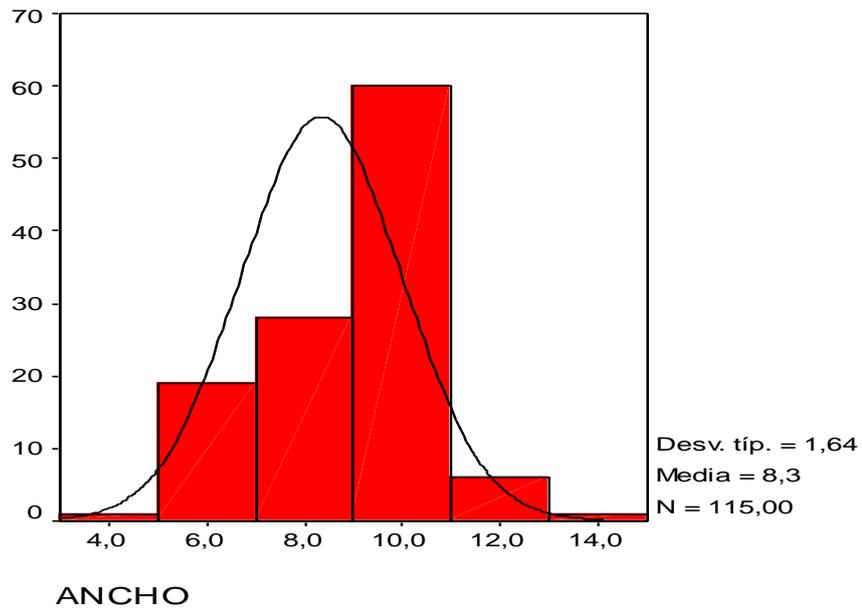
Para estimar la proporción de pelos telogénicos en la cabeza del individuo tomamos 300 como valor máximo AxL de las mediciones realizadas con la población muestral de pelos caídos o telogénicos (Ver histograma de valores AxL de bulbos caidos, excluimos 1 caso extremo de valor 400), y extrapolamos dicho valor con los observados en la tabla de valores AxL de pelos arrancados (grupo que representa todos los estadios en un solo individuo en un mismo muestreo, al comparar con la población de pelos arrancados la proporción acumulada hasta el valor de 300 es del 20% de la población total (remarcado con amarillo) es decir, que del muestreo podemos concluir que en la cabeza del individuo, aproximadamente el 20% de los bulbos pilosos se hallan en estadio telogénico y el 80% restante representa el porcentaje de bulbos en estadio anagénico; entre ambas subpoblaciones se encuentran los bulbos en estadio catágeno, que al ser una fase de regresión establecida por la terminación de la mitosis en las células de la matriz celular del bulbo es dificultosa establecerla solamente con las variables cuantitativas.

Encontramos en la bibliografía, otros estudios afirmando que en una cabeza saludable, del 80 al 90% de los folículos se encuentran en la fase de anágeno, 2% catágeno y 10 al 18% en la fase de telogeno (Ham W. Arthur, Cormack H. David, 1983)

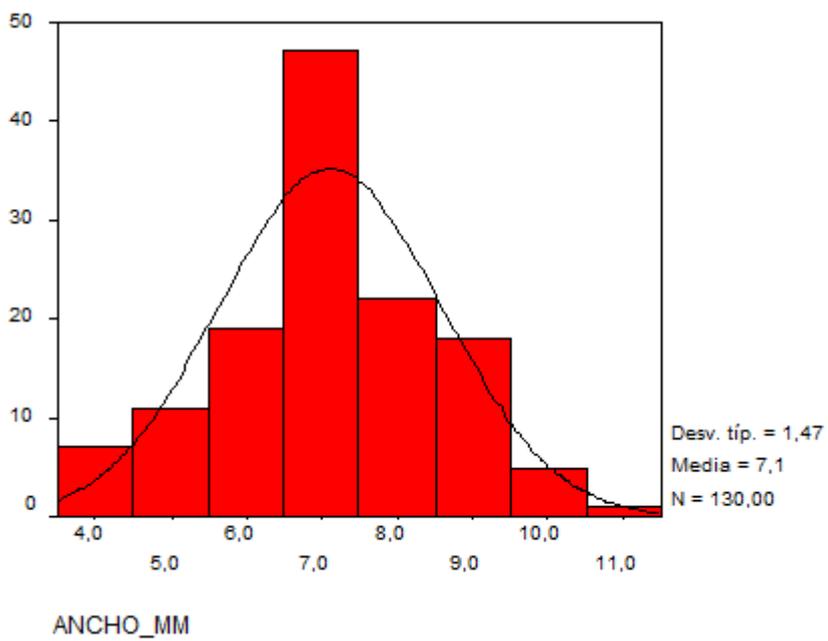
Distribución de los valores medidos del largo en los bulbos de pelos arrancados.



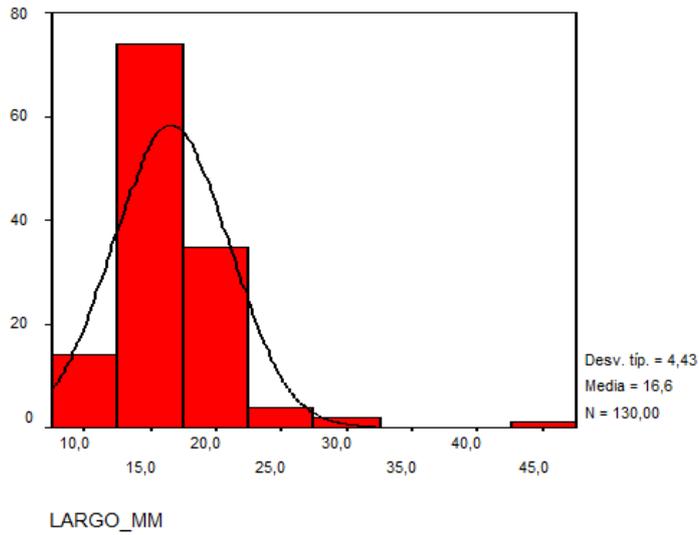
Distribución de los valores medidos del ancho en los bulbos de pelos arrancados



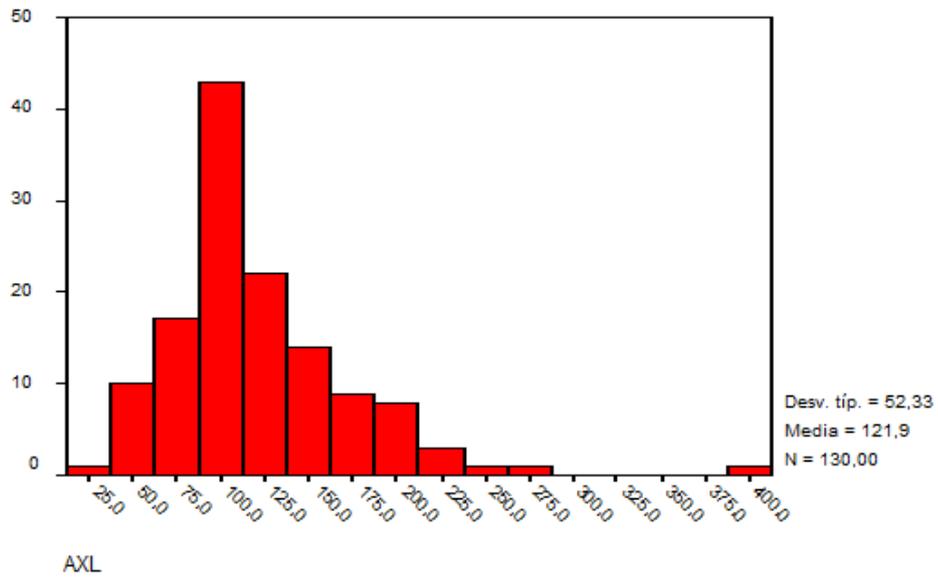
Distribución de los valores medidos del ancho en los bulbos de pelos caídos espontáneamente



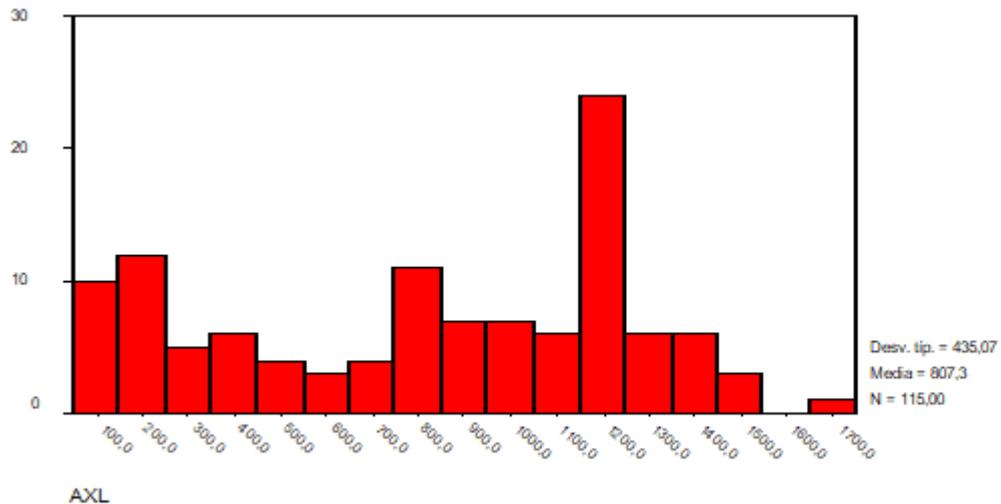
Distribución de los valores medidos del largo en los bulbos de pelos caídos espontáneamente



Distribución de los valores resultantes del Ancho x Largo en los bulbos de los caídos.



Distribución de los valores resultantes del Ancho x Largo en los bulbos de pelos arrancados.



## EFICIENCIA EN LA OBTENCIÓN DE PERFILES GENÉTICOS A PARTIR DE LAS MUESTRAS Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EVALUADOS.

### Bulbos de pelos arrancados.

A partir de los bulbos correspondientes a pelos arrancados se obtuvieron resultados variables en cuanto a la amplitud de la señal obtenida en cada caso, la fidelidad de la información y la reproducibilidad de los resultados. No obstante, las muestras ensayadas fueron tipificadas con resultados positivos, independientemente del método empleado, lo que indica que para este tipo de muestra el contenido de ADN no es un limitante. En algunos casos se observó amplificación diferencial de alelos en algunos marcadores y ausencia de alelos en otros, las que se analizaron con relación al método de extracción.

Por razones de disponibilidad de reactivos, las extracciones de ADN de pelo arrancado con Minicolumnas y Resinas fueron amplificadas con ProfilerPlus que testea 10 marcadores STR.

Para analizar la información obtenida se realizó la comparación de los resultados en dos niveles de análisis:

Entre los Métodos de extracción de ADN y entre los distintos marcadores STRs usados para el tipificado.

Se observó que la variabilidad de obtención de señal (RFUs) fue alta lo que indica que la heterogeneidad no pudo ser controlada sobre la base de la selección morfológica. Hay que considerar que es muy probable que la divergencia de los datos surja a partir de una falta de homogeneidad en el contenido y calidad del ADN de los filamentos ensayados. A pesar de la gran variabilidad intra grupo el análisis de varianza puso en evidencia diferencias significativas entre los resultados obtenidos con el método estándar y el método con incubación a 95° en medio caotrópico.

Tabla 3. Pérdida alélica en cada Método

	ESTÁNDAR(A)	CALOR(B)	RESINAS(C)
Dropout o Pérdida alélica (de 10 STRs)	12 Alelos	16 Alelos	6 Alelos

### Comparación entre Marcadores.

Los amplicones de los STRs utilizados en el Kit para PCR Multiplex tienen longitudes en pares de bases que van desde 107 pb como es el caso para el marcador STR Amelogenina a 341pb para el STR D18. Si comparamos las longitudes de los amplicones con la señal obtenida en cada locus STR, se observa que la disminución de la señal y comienza a partir de alelos tipificados que tienen 202pb de longitud. Esta pérdida de señal aumenta con la longitud de los STR.

La diferencia la eficiencia de la amplificación de cada locus en un sistema de coamplificación lo referimos como amplificación preferencial de marcadores. Si bien es de esperar una menor eficiencia en los locus de mayor tamaño, el efecto se incrementa cuando el ADN se encuentra degradado, llevando al desbalance entre los picos heterocigotas y la pérdida alélica. Dependiendo del marcador, para algunos

casos se detecta desbalance en heterocigosis y pérdida alélicas, aleatoriamente lo que podría ser considerado como un indicio de degradación en las muestras. El efecto más pronunciado se hace evidente para el marcador D18S51, del cual es conocida la tendencia al drop out y el desbalance.

### **Bulbos de pelos caídos.**

Los bulbos de pelos caídos suelen encontrarse en un estadio avanzado de crecimiento (Telogénico), razón por la cual estas muestras pueden presentar poco ADN y hallarse en estado degradado.

#### **a) Cuantificación por PCR Real Time.**

La cuantificación de las muestras de ADN por PCR en tiempo real arrojó resultados muy variables. Como hemos visto anteriormente, más allá de la morfología del bulbo, la eficiencia para la obtención de ADN está condicionada a la presencia de núcleos (Bourguignon Luc y colaboradores, 2008). Esta característica es altamente variable en los filamentos de caída espontánea.

La variabilidad entre las cuantificaciones de muestras morfológicamente homogéneas no unifica la cantidad ni la calidad del ADN recuperado. En el caso extremo de la muestra que presentó 2ng puede estar relacionado con material genómico que no es exclusivo del bulbo piloso.

Según los protocolos modificados a temperatura ambiente se recuperó más ADN que con los protocolos estándar.

Vemos nuevamente la temperatura como factor influyente en la eficiencia de los métodos de extracción en estas muestras. Como en el caso de pelos arrancados donde la incubación a altas temperaturas fue nociva, procesar las muestras de pelos caídos a temperatura ambiente sin pasos de incubación con altas temperaturas favorece la recuperación del ADN en estas muestras.

#### **b) Recuperación de perfiles en los pelos de caída espontánea.**

Los perfiles recuperados reflejan efectivamente los resultados de las cuantificaciones. Confirmando de esta forma la mayor eficiencia de las columnas, con incubación a temperatura ambiente. Los perfiles completos están asociados a las muestras a partir de las que se recuperó una concentración de ADN no limitante. En el resto de los casos los perfiles son incompletos y la señal recuperada muy baja.

Se observaron diferencias en los resultados de las columnas, relacionadas con la temperatura de incubación, con una eficiencia mayor para la obtención de perfiles cuando la incubación de las muestras en medio caotrópico se realizó a temperatura ambiente y no a 70° como sugiere el protocolo estándar. El método de resinas magnéticas por su parte no permitió obtener ADN en cantidad suficiente como para recuperar un perfil genético. Observación que concuerda los relevamientos de casos reales realizados en la etapa inicial de nuestro trabajo.

Con el Método de Microcolumnas se observó diferencia importante entre los 2 protocolos, en el protocolo estándar no se obtuvo ningún perfil, y con el protocolo modificado a temperatura ambiente se obtuvieron perfiles incompletos en 4 muestras y un perfil completo en 1 muestra.

Como se observa en los electroferogramas, sólo uno de los perfiles se recuperó con una muy buena señal. El resto se encuentra en la zona por debajo del umbral estocástico (señal < 100 RFU para los alelos), con un electroferogramas característico de las muestras con muy bajo contenido de ADN. A consecuencia, se observó pérdida alélicas importante y mezcla que puede ser explicada considerando la probabilidad de lo que se conoce con el nombre de drop in (Gill et al., 2000; Gill, 2001; Poy et al., 2006). En muchos casos, si bien no hay alelos declarados por el requerimiento del umbral mínimo de 50 RFU, es posible identificar el pico correspondiente (Marcadores D19 y el locus TPOX en el color negro). Estos resultados pueden ser mejorados aplicando el protocolo para muestras con bajo número de copias que se encuentra en etapa de validación en el Laboratorio. El protocolo de mención incluye un aumento en el número de ciclos, reducción del volumen de reacción y aumento de la taq polimerasa en la reacción de PCR y purificación post- amplificación.

## CONCLUSIONES.

La documentación cronológica y minuciosa es importante para velar por la trazabilidad y la continuidad de las pruebas durante todo el proceso. La cadena de custodia determina que lo que se presenta ante el tribunal guarda relación con el objeto concreto recogido en la escena del delito.

Los métodos de recogida adecuados permiten evitar la pérdida, degradación o contaminación de las pruebas.

Toda evidencia relacionada con un hecho delictivo debe ser levantada con una lógica de clasificación que permita posteriormente relacionarlos con las etapas del hecho y las circunstancias del mismo.

La incorporación de muestras de transferencias de material genético y el análisis de ADN representa un segmento cada vez más relevante, involucrando tanto a causas graves como de menor grado. Debido a las particularidades que presentan, este tipo de rastros constituyen un desafío para la optimización de técnicas y protocolos utilizados desde el levantamiento de muestras hasta la culminación de la pericia de ADN.

Se debe tener una comprensión del tipo de muestra para optimizar el procedimiento en la toma y valorar su aporte.

La morfología del filamento piloso es dependiente de la actividad cíclica de crecimiento y debe evaluarse para fines técnicos de laboratorio forense.

Del relevamiento de los resultados de filamentos pilosos de casos forenses se observó una diferencia en la eficiencia en la obtención de perfiles, siendo superior en una de las dos marcas de columnas de purificación.

La eficiencia de la obtención de perfiles cuando se trata de bulbos pilosos arrancados es óptima.

El método con resinas magnéticas en bulbos de pelos arrancados brinda resultados más homogéneos. Sin embargo, en bulbos pilosos caídos fue el menos efectivo.

El filamento piloso tiene como ventaja que es una muestra recurrente, sin embargo requiere establecer criterios sobre la relación con el hecho, tener un protocolo de levantamiento adecuado para mejorar no solo la probabilidad de obtención de un perfil completo si no también su validez como muestra forense.

La evidencia del cabello solo tendrá valor cuando se sume a otra evidencia.

## BIBLIOGRAFIA.

Butler, J. (2005). DNA biology review. *Forensic DNA Typing* (pp. 13-24). Londres: Academic Press.

Butler, J. (2012). DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 29-40). Londres: Academic Press

Butler, J. (2001). Overview and history of DNA typing. *Forensic DNA Typing* (pp.1-10). Londres: Academic Press.

Deedrick, D. (Julio, 2000). Hairs, Fibers, Crime and Evidence. Federal Bureau of Investigation, 2 (3). Recuperado de <https://archives.fbi.gov/archives/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/deedric3.htm>

Fernandez, R. Ramirtez, A. Crespillo, M. Luque, J. Garcia, P &Valverde, J. (1996). Forensic use of PCR DNA analysis in hairs, envelopes and cigarette ends. *Advances in Forensic Haemogenetic*, 6, 249-251.

Greenhalgh, M. (1996). Casework experiences with a multiplex STR system. *Advances In Forensic Haemogenetic*, 6, 249-251.

Martinez Jarreta, B. (1999). Introducción al estudio de los polimorfismos del ADN en Medicina Forense. *La Prueba del ADN en Medicina Forense* (pp. 52-71). Barcelona: Masson.

Martinez Jarreta, B. (1999). Restos Biológicos de interés Forense. *La Prueba de ADN en Medicina Forense* (pp. 138-151). Barcelona: Masson.

Moller, A. Brinkmann, B. (1994). Extraction and PCR amplification of DNA from hair shafts. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5, 336-338.

Penacino, G.A. (1997). Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular, con especial referencia a los estudios post-mortem. (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, Buenos Aires Argentina.

Penacino, G. Sala, A. Corach, D. (1994). Post-mortem molecular identification. Biological kinship established by DNA analysis. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 5, 289-291.

Peña, M. Cepeda, M. Cáceres, V. Sánchez, F. (2019). Estudio de Tricología Forense en casos donde el Elemento Piloso es Crucial para la Investigación, como Indicio en un Hecho Delictivo. *Revista electrónica Ciencia Digital*. Recuperado de <https://cienciadigital.org/revistacienciadigital2/index.php/CienciaDigital/article/view/404>

Promega Corporation, Tissue and hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™) Protocol. Technical Bulletin N 307, (2011).

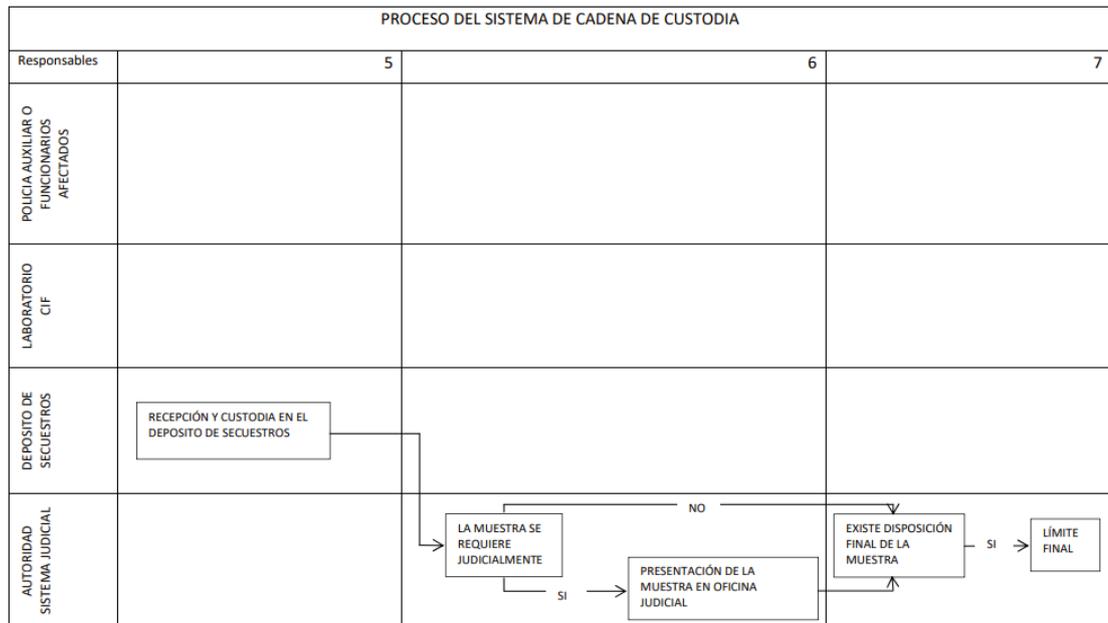
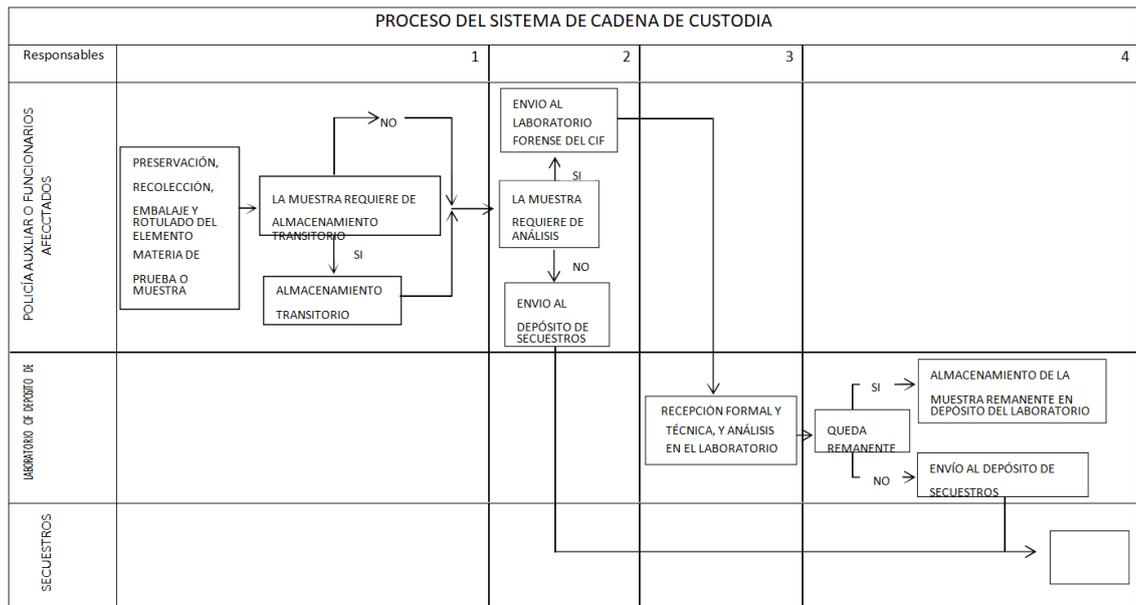
Protocolo unificado de los ministerios públicos de la República Argentina: guía para el levantamiento y conservación de la evidencia / Anónimo. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ediciones SAIJ, 2017. Libro digital, EPUB.

Robertson, S. (2019). Análisis del pelo en ciencia forense. News-Medical. Recuperado de <https://www.news-medical.net/life-sciences/Hair-Analysis-in-Forensic-Science.aspx>.

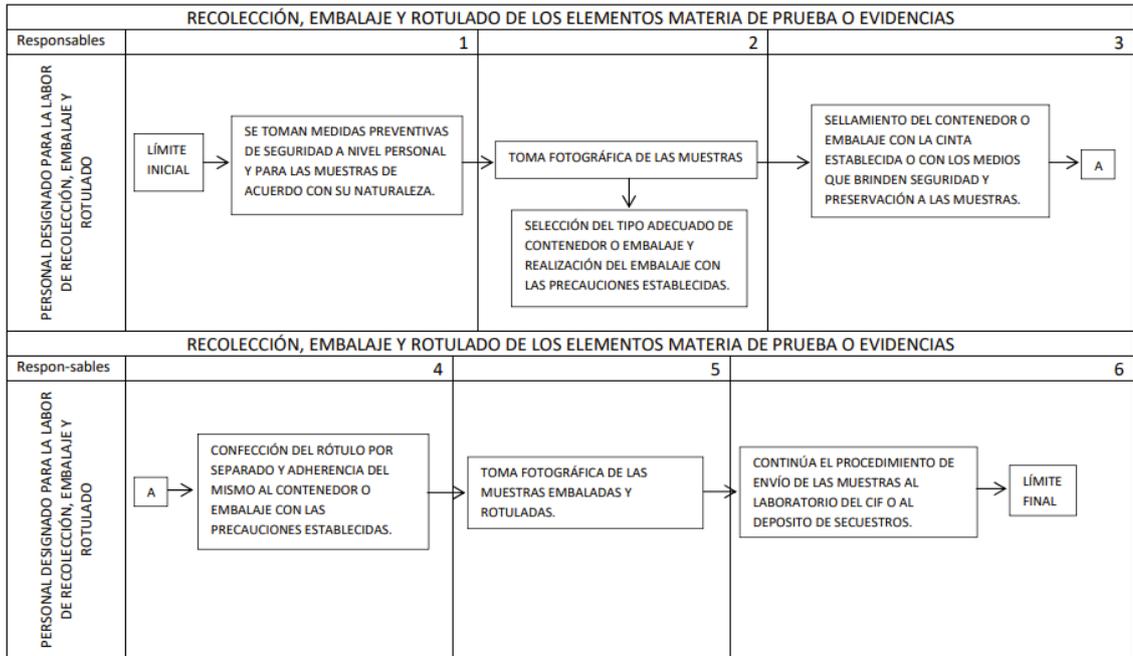
Yoshii, T. Akiyama, K. Tamura, K. Ishujama, I. (1994). PCR inhibitor: water-soluble melanin, which inhibits DNA polymerases and DNases. *Advances in Forensic Haemogenetic*, 5,393-396.

## ANEXOS.

### DIAGRAMA DEL PROCESO DEL SISTEMA DE CADENA DE CUSTODIA



## RECOLECCIÓN, EMBALAJE Y ROTULADO DE LOS ELEMENTOS MATERIA DE PRUEBA O EVIDENCIAS



## RECEPCIÓN Y CUSTODIA DE LOS ELEMENTOS MATERIA DE PRUEBA O EVIDENCIAS EN EL DEPÓSITO DE SECUESTROS

