Archivos de Criminología, Seguridad Privada y Criminalística

ISSN: 2007-2023.

Fecha de recepción: 13/08/2014
Fecha de aceptación: 15/09/2014

Efecto del tiempo y la temperatura en la viabilidad del ADN en la perfilación genética de muestras de sangre

Effects of time and temperature in the viability of DNA in genetic profiling of blood samples

Investigación ganadora del concurso internacional de investigaciones criminológicas en México 2014

Otorgándose la medalla:

"JOSÉ ADOLFO REYES CALDERÓN"

Lic. Christian Ramón Hernández Sánchez
Laboratorio GENTEST
chernandez_gentest@hotmail.com
México

Resumen

En el presente estudio se determinó la viabilidad del ADN con la obtención de un perfil genético a partir de muestras de sangre humana del sexo masculino, sometidas variaciones de temperatura y humedad. La metodología consistió en una preparación de las muestras, extracción del ADN, amplificación por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) del marcador genético Amelogenina y finalmente una secuenciación de ADN. Se determinó la incidencia de amplificación efectiva al obtener un perfil completo, parcial o nulo de la muestra problema. Las muestras de sangre humana con más de ocho días de exposición arrojaron una baja amplificación. La presente investigación trata de igualar las condiciones que presenta un lugar de los hechos, el tipo de muestras encontradas, con el fin de que la información recabada sea de utilidad para establecer cuáles muestras son más viables de ser analizadas en del laboratorio.

Palabras clave: ADN, Amplificación, Sangre, Temperatura, Viabilidad.

Abstract

In this study has been investigated the feasibility of obtaining DNA genetic profiling of biological samples from male human blood subject temperature and humidity factors. The methodology consisted of a sample preparation, DNA extraction, PCR amplification of genetic marker Amelogenin and finally DNA sequencing, we determined the incidence of effective amplification to obtain a complete profile, partial or no sample problem. Furthermore human blood samples over eight days of exposure showed a lower amplification. This research seeks to level the playing field having a scene, the type of samples found, so that the information gathered in this research is very useful trying to help establish viable which samples are to be analyzed in the laboratory.

Key words: Amplification, DNA, Blood, Genetic profile, Temperature, Viability.

Introducción

El conocimiento más detallado de las regiones del DNA ha permitido utilizarlo para diferenciar a un individuo o determinar sus relaciones biológicas de parentesco. En 1985, Alec Jeffreys fue el primero en realizar estudios, obteniendo un patrón de bandas parecido a un código de barras que denominó huella digital del ADN o huella genética. Los marcadores moleculares de elección para estas pruebas son las regiones con repeticiones tándem de número variable (VNTR) y las repeticiones cortas en tándem (STR), los cuales poseen unidades de repetición de 30 pb en promedio, y de 2 a 5 pb, respectivamente (Rudin, 2002).

Al utilizar cualquier marcador molecular en pruebas de identidad es importante considerar que el ser humano es un organismo diploide, es decir, que su material genético está en doble dosis, una heredada del padre y otra de la madre. Por ejemplo para un STR del cromosoma 1 con una estructura AGT AGT AGT AGT con repeticiones, cada persona se identifica de acuerdo con el número de repeticiones que tenga el STR de sus dos cromosomas 1, es decir, por sus dos alelos, de manera que al

observar a un individuo con un genotipo 6/4 para ese STR, se puede inferir que forzosamente sus padres tendrán alguno de estos alelos. Al ir analizando varios marcadores en un individuo, se va creando un código conocido también como perfil de DNA. A la fecha, una de las técnicas más utilizadas para obtener perfiles de DNA es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que permite generar millones de copias o amplificar los VNTR y STR a partir de cantidades mínimas de muestra. Posteriormente, el par de alelos de un individuo puede observarse con facilidad mediante diferencias en migración al someter los productos amplificados a electroforesis, razón por la cual la técnica también se conoce como polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados o Amp-FLP. Los STR tienen una ventaja adicional debido a su tamaño pequeño, ya que varios se pueden amplificar en una sola reacción, conocida como PCR multiplex y analizarse en una sola electroforesis (Guízar, 2001).

Éste es el principio de la identificación humana por vía genética: Si se estudia con detalle una serie de características del ADN será capaz identificar a una persona frente a todas las demás. No es necesario estudiar todo el ADN, igual que no es necesario observar a una persona de cerca para diferenciarla de otra. Del mismo modo el ADN presenta una serie de características que permiten establecer con cierta rapidez una identificación. Esto es muy útil, pues si hubiera que estudiar todo el ADN el tiempo necesario y el coste haría inviable el intento. La introducción de las técnicas de análisis del ADN en la criminalística ha supuesto una verdadera revolución por varias razones, entre las cuales se destacan las siguientes: El ADN de cada persona es único, y convenientemente analizado sirve para diferenciar a un ser humano de entre todos los demás. El ADN es común en todas las células del cuerpo. Es posible obtener información de indicios biológicos aunque haya pasado mucho tiempo desde el momento en que fueron depositados, incluso muchos años después (Rudin, 2002). Según José Adolfo Reyes Calderón (1998) se entiende como rastro a cualquier vestigio perceptible o imperceptible que dejan las personas, los animales o las cosas al cambiar de ubicación o al descomponerse. El rastro tiene relación con la prueba material y concretamente con la prueba circunstancial. El rastro en consecuencia, se relaciona circunstancialmente con el hecho, con las personas vinculadas, con el tipo, el modo, el lugar y el móvil de la acción u omisión.

Lo anterior tomando en cuenta el trabajo realizado en el lugar de los hechos o del hallazgo el cual deberá llevarse a cabo de una manera correcta con la ayuda de la criminalística como lo refiere José Adolfo Reyes Calderón (2005), en su libro titulado "Tratado de Criminalística", que la Criminalística es "la ciencia aplicativa que utiliza heterogéneos conocimientos, métodos y técnicas de investigación de las ciencias, para establecer cómo, cuándo, dónde, quién y en qué circunstancias acaeció un hecho o dejo de acaecer".

La Criminalística, así entendida, es una ciencia aplicada o aplicativa (Reyes Calderón, 2005) que, valiéndose de peritos o expertos en determinada materia, emite y plasma sus hallazgos en los, bien llamados, informes periciales a efectos de que su concurso y conocimiento pueda coadyuvar a un mejor entendimiento de los sucesos por parte de los operadores de justicia, en procesos judiciales en general, en procesos administrativos o, que sus hallazgos puedan ser utilizados por cualquier individuo en particular, para cualquier asunto particular.

Cada día se les concede mayor valor a las evidencias físicas en los procesos judiciales, lo que sumado al avance del análisis de pruebas de los laboratorios criminológicos, aumenta la responsabilidad de que tienen a su cargo la persecución

penal, ya que la escena del crimen deberá hacer una minuciosa investigación, recolección, embalaje, manejo y transporte de evidencias (Reyes Calderón, 1998).

Debido a la poca información publicada de estudios que avalen estadísticamente la viabilidad de las muestras ante factores ambientales para una perfilación genética, el presente proyecto pretende comprobar si los factores ambientales tales como humedad y temperatura presentan un efecto directo que imposibilite o dificulte la aplicación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para la obtención de un perfil genético de identificación que pueda ser utilizado en una aplicación forense. Como resultado de la aplicación de las metodologías de recolección, extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación en muestras biológicas de sangre degradada, se pretende obtener una estandarización que permita calcular de manera indirecta si una muestra que se encuentra en un lugar de los hechos como indicio biológico, dentro de una investigación criminal es válida y viable o no para la obtención de un perfil genético que pueda ser usado con fines de comparación e identificación humana.

El objetivo general del presente estudio fue el determinar la viabilidad del ADN con la obtención de un perfil genético de muestras biológicas de sangre humana del sexo masculino, sometidas a diferentes niveles de temperatura y tiempo.

Como objetivos específicos se tuvieron los siguientes:

- Se analizaron muestras representativas de sangre que se sometieron a tratamientos de temperatura y tiempo;
- Se valoró la amplificación de PCR del marcador genético Amelogenina (sexo biológico), para la posible obtención de un perfil genético de las muestras previamente expuestas a factores ambientales, y
- Se determinó la Incidencia de amplificación efectiva al obtener un perfil completo, parcial o nulo de la muestra problema.

Los principios de divisibilidad y transferencia de la materia interactúan en la generación de indicios/evidencias, antes y durante el hecho criminal, la investigación forense comienza después del crimen, con la inspección ocular del lugar de los hechos y la localización y detección de evidencias e indicios, en particular de los biológicos para el análisis de ADN, como base de la investigación criminal. Se debe llevar a cabo una buena recolección y embalaje de cada uno de los objetos o elementos de interés para investigación criminal (evidencia) que porta posibles restos biológicos susceptibles de análisis (indicios) al ser examinados en el laboratorio. Los restos biológicos se encuentran en situaciones adversas cuando abandonan las condiciones controladas y estables del organismo, principalmente por las variables medio ambientales como temperatura y humedad, a la exposición a sustancias químicas o de microorganismos, hongos y bacterias, ocasionando la degradación del indicio o la inhibición de los análisis, circunstancias que limitan la lectura de la información genética traduciéndose en la obtención de resultados parciales o incluso la no obtención de resultados (Jeffreys, 1985).

La sangre es una excelente fuente de ADN, asociada a muchos ilícitos, sin embargo el ADN contenido en el núcleo de los glóbulos blancos está en una proporción minoritaria. La relación 400:1 de células rojas (sin núcleo) en relación con las células blancas, coloca la sangre en el segundo nivel de fuentes de ADN o categoría II en términos de producto de ADN respecto al volumen de muestra (Jeffreys, 1985).

La importancia propia de la recolección de evidencia con ADN no debe ser minimizada. Si la muestra de ADN está contaminada desde el principio, se obtiene información ambigua que se convierte en un reto importante en la investigación forense, pues puede llegar a comprometer los resultados. Las muestras recolectadas deben ser escogidas cuidadosamente para prevenir la redundancia de la evidencia en el caso (Butler, 2005).

Material y método

1. **Diseño de experimento**. Se establecieron los protocolos de toma y de colocación de muestras. Se estandarizó el protocolo de extracción de ADN por resinas quelantes llamadas Chelex y con el kit comercial DNA IQ System, Resinas magnéticas de la marca Promega. Se analizaron los factores de temperatura y humedad.
2. **Preparación de las muestras**. La muestra de sangre humana se tomó por punción venosa en tubo vacutainer sin anticoagulante EDTA de una persona de sexo biológico masculino. Se continuó con la preparación de las muestras colocando cuatro muestras con manchas representativas de 100 µl de sangre en soportes de tela de algodón aproximadamente de 2 cm de ancho por 2 cm de alto, las cuales fueron sometidas a factores de temperatura y humedad. Los rangos de temperatura y humedad que se utilizaron, son basados en la bibliografía y tomando en cuenta los valores de temperatura y humedad promedio registrados en Aguascalientes. Los parámetros y los intervalos de temperatura se establecieron como temperatura máxima (37 °C), temperatura media (temperatura ambiente) y temperatura mínima (4 °C), en cuanto a la Humedad relativa solo se tomó en cuenta su relación con la temperatura media (temperatura ambiente), por periodos de exposición de 1/ 2/ 4/ 8/ 16/ 32/ 64 días. Se realizó un muestreo de cada una de las muestras sanguíneas expuestas a factores ambientales, mediante el "Manual de recolecta para indicios en Genética Forense" (Penacino, 2009).
3. **Extracción del ADN**. De las manchas colocadas en soportes de tela de algodón se realizó un corte de 1 cm^2, el cual se resuspendio en 1000 µl agua desionizada, realizando lavados para eliminar el exceso de hemoglobina y comenzar con la extracción del material genético, la extracción de ADN se llevó a cabo por el método de resinas quelantes llamadas Chelex ® y el kit comercial DNA IQ System Resinas magnéticas de la marca Promega.
4. **Amplificación por PCR del marcador genético Amelogenina**. Se realizaron 84 amplificaciones de ADN de las muestras con manchas biológicas de sangre degradadas, expuestas bajo las tres temperaturas o variables utilizadas (máxima, media/humedad y mínima), durante los intervalos de 1/ 2/ 4/ 8/ 16/ 32 y 64 días, utilizando el marcador genético Amelogenina (sexo biológico).
5. **Secuenciación de ADN.** (Manual de PROMEGA, 2008) Se llevó a cabo la secuenciación de 84 muestra con manchas biológicas de sangre degradada, tanto en una matriz de gel de agarosa como en gel de poliacrilamida. El protocolo utilizado para realizar la secuenciación de ADN en gel de agarosa se llevó acabo en cuatro fases que fue la preparación de agarosa, se colocó la agarosa en la cámara de electroforesis y finalmente se corrieron las muestras. Por otro lado el protocolo utilizado para realizar la secuenciación de ADN en gel de poliacrilamida se realizó de igual forma en cuatro fases, la preparación de los vidrios de electroforesis, la

preparación del gel de poliacrilamida, el corrimiento de las muestras y el revelado de las muestras.

Resultados

Tabla No.1. Temperaturas y Humedad Relativa del ambiente registradas en lugar del diseño experimental.

FECHA	TEMPERATURA 8:00 HORAS	TEMPERATURA 14:00 HORAS	TEMPERATURA 20:00 HORAS	HUMEDAD RELATIVA 8:00 HORAS	HUMEDAD RELATIVA 14:00 HORAS	HUMEDAD RELATIVA 20:00 HORAS
24/10/2012		24.8 °C		39%		
25/10/2012		24.8°C	25.3°C		33%	32%
26/10/2012		25.3°C	24.6°C		33%	36%
30/10/2012		23.1°C	21.6°C		33%	38%
31/10/2012		22.9°C	21.3°C		38%	39%
01/11/2013		22.9°C	20.5°C		33%	39%
03/11/2012	19.9°C	22.0°C		41%	39%	
05/11/2012		20.5°C	19.4°C		40%	54%
06/11/2012		20.9°C	19.1°C		41%	45%
07/11/2012		20.1°C	18.6°C		36%	41%
08/11/2012		20.0°C	18.9°C		35%	38%
10/11/2012	18.8°C	21.3°C		37%	35%	
12/11/2012		21.3°C			41%	
13/11/2012		21.3°C	19.5°C		41%	48%
14/11/2012		21.2°C	20.1°C		41%	47%
15/11/2012		21.7°C	20.2°C		42%	47%
16/11/2012		22.1°C	20.7°C		41%	47%
17/11/2012	19.6°C	21.5°C		49%	43%	
22/11/2012		20.8°C	19.5°C		41%	43%
23/11/2012		21.4°C	19.9°C		40%	46%
24/11/2012	18.5°C	22.1°C		52%	41%	
26/11/2012		19.5°C	18.4°C		38%	43%
27/11/2012		20.1°C	17.8°C		42%	50%
28/11/2012		19.5°C	18.1°C		45%	41%
29/11/2012		19.2°C	18.4°C		42%	49%
03/12/2012		20.6°C	19.7°C		41%	41%
04/12/2013		20.5°C	19.5°C		31%	34%
05/12/2012		20.0°C	18.9°C		33%	33%
06/12/2012		19.7°C	18.6°C		33%	35%
07/12/2012		19.8°C	18.6°C		33%	35%
08/12/2012		17.5°C	20.2°C		35%	30%
09/12/2012		18.8°C			42%	
13/12/2012			17.8°C			49%
14/12/2012		18.8°C	18.3°C		48%	46%
15/12/2012		19.5°C			41%	
17/12/2012		19.1°C			32%	
18/12/2012		18.5°C	18.3°C		29%	33%
19/12/2012		18.5°C	18.4°C		37%	40%
20/12/2013		18.4°C	18.6°C		30%	32%

04/01/2013		16.6°C	16.5°C		54%	56%
08/01/2013		16.7°C	16.9°C		60%	63%
10/01/2013			16.6°C			51%
11/01/2013		18°C			47%	
16/01/2013			16°C			18%
17/01/2012			14.1°C			29%
19/01/2013		25.9°C	25°C		43%	45%
20/01/2013		23.2°C	25.3°C		49%	44%
22/01/2013		26°C	25.2°C		31%	27%

Nota: La humedad relativa solo fue tomada como referencia para este diseño experimental.

Tabla No.2. Resultados de extracción de ADN por el método de Chelex ®, de las muestras en tela de algodón expuestas en los diferentes tratamientos de temperatura y de tiempo.

DÍA DE EXPOSICIÓN	**Calidad de la Extracción por el método de Chelex de muestras expuestas a Temperatura mínima, media, máxima**	**Porcentaje de Extracción**
1	12 MUESTRAS DE12	100%
2	10 MUESTRAS DE12	83%
4	10 MUESTRAS DE12	83%
8	8 MUESTRAS DE 12	66%
16	6 MUESTRAS DE 12	50%
32	6 MUESTRAS DE 12	50%
64	6 MUESTRAS DE 12	50%

Tabla No.3. Resultados de extracción de ADN por el método de DNA IQ System, Resinas magnéticas, de las muestras en tela de algodón expuestas en los diferentes tratamientos de temperatura y de tiempo.

DÍA DE EXPOSICIÓN	**Calidad de la Extracción por el método de de DNA IQ System, Resinas magnéticas de muestras expuestas a Temperatura mínima, media, máxima**	**Porcentaje de Extracción**
1	12 MUESTRAS DE12	100%
2	12 MUESTRAS DE12	100%
4	12 MUESTRAS DE12	100%
8	12 MUESTRAS DE 12	100%
16	10 MUESTRAS DE 12	83%
32	10 MUESTRAS DE 12	83%
64	8 MUESTRAS DE 12	66%

Tabla No.4. Resultados de amplificación de las muestras en tela de algodón en los diferentes tratamientos de temperatura y de tiempo. **+++** = Bien amplificado, **++** = Medianamente amplificado, **N.A**.= No Amplifico.

SOPORTE	CONDICIÓN		
	TEMPERATURA MÍNIMA 4°C	TEMPERATURA MEDIA AMBIENTE	TEMPERATURA MÁXIMA 37°
24 HORAS (1 DÍA)			
Muestra 1	+++	+++	+++
Muestra 2	+++	+++	+++
Muestra 3	+++	+++	+++
Muestra 4	+++	+++	+++
48 HORAS (2 DÍAS)			
Muestra 1	+++	+++	+++
Muestra 2	+++	+++	+++
Muestra 3	+++	+++	+++
Muestra 4	+++	+++	+++
96 HORAS (4 DÍAS)			
Muestra 1	+++	+++	+++
Muestra 2	+++	+++	++
Muestra 3	+++	+++	++
Muestra 4	+++	+++	+++
192HORAS (8 DÍAS)			
Muestra 1	+++	++	N.A
Muestra 2	+++	++	++
Muestra 3	+++	++	++
Muestra 4	N.A	++	++
384 HORAS (16 DÍAS)			
Muestra 1	+++	++	++
Muestra 2	+++	++	++
Muestra 3	+++	++	++
Muestra 4	+++	+++	++
768 HORAS (32 DÍAS)			
Muestra 1	+++	++	++
Muestra 2	+++	+++	++
Muestra 3	+++	++	++
Muestra 4	+++	+++	N.A.
1536 HORAS (64 DÍAS)			
Muestra 1	N.A	++	N.A.
Muestra 2	++	N.A.	N.A.
Muestra 3	++	N.A.	++
Muestra 4	++	++	N.A.

Tabla No. 5. Promedio de Temperatura Ambiente y Humedad relativa registradas en el lugar del diseño experimental.

TEMPERATURA AMBIENTE PROMEDIO	20.20°C
HUMEDAD RELATIVA PROMEDIO	40%

Tablas No. 6 y 7. Porcentaje de Amplificación relación Días- Temperaturas. Se puede observar que la probabilidad de amplificar es más alta en los tratamientos de 1/2/4 días.

DÍA	Muestras amplificadas Temperatura mínima, media, máxima	Porcentaje de Amplificación
1	12 MUESTRAS DE 12	1.00
2	12 MUESTRAS DE 12	1.00
4	10 MUESTRAS DE 12	0.83
8	3 MUESTRAS DE 12	0.25
16	5 MUESTRAS DE 12	0.42
32	6 MUESTRAS DE 12	0.5
64	0 MUESTRAS DE 12	0

DÍA	Muestras amplificadas Temperatura mínima, media, máxima	Porcentaje de Amplificación
1	12 MUESTRAS DE 12	100 %
2	12 MUESTRAS DE 12	100 %
4	10 MUESTRAS DE 12	83 %
8	3 MUESTRAS DE 12	25 %
16	5 MUESTRAS DE 12	42 %
32	6 MUESTRAS DE 12	50 %
64	0 MUESTRAS DE 12	0 %

Gráfica No. 1. Grafica que muestra la Probabilidad de Amplificación relación Días- Temperaturas de las muestras de sangre expuestas.

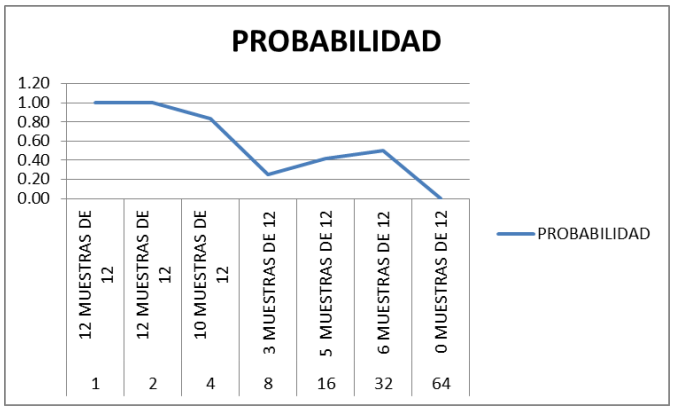

Tabla No. 8. Porcentajes de Buena amplificación (+++), relación día- temperatura
Existe una probabilidad más alta de 0.821 de tener una buena amplificación en muestras que se encuentran expuestas a una temperatura mínima de 4°C, independientemente de los días transcurridos excepto

Día	Temperatura Mínima 4°C	Temperatura Media Ambiente	Temperatura Máxima 37°C
1	0.143	0.143	0.143
2	0.143	0.143	0.143
4	0.143	0.143	0.071
8	0.107	0.000	0
16	0.143	0.036	0
32	0.143	0.071	0
64	0	0.000	0
Porcentaje Total	**0.821**	**0.536**	**0.357**

Tabla No. 9. Porcentajes de Media amplificación (++), relación día- temperatura

Existe una probabilidad más alta de 0.464 de tener una media amplificación en muestras que se encuentran expuestas a una temperatura máxima de 37°C, independientemente de los días transcurridos.

Día	Temperatura Mínima 4°C	Temperatura Media Ambiente	Temperatura Máxima 37°C
1	0.00	0.000	0.000
2	0.00	0.000	0.000
4	0.00	0.000	0.071
8	0.00	0.107	0.107
16	0.00	0.143	0.143
32	0.00	0.107	0.107
64	0.11	0.036	0.036
Porcentaje Total	**0.107**	**0.393**	**0.464**

Tabla No. 10. Porcentajes de No Amplificación (N.A.), relación día- temperatura

Existe una probabilidad más alta de 0.179 de no tener una amplificación en muestras que se encuentran expuestas a una temperatura máxima de 37°C, independientemente de los días transcurridos.

Día	Temperatura Mínima 4°C	Temperatura Media Ambiente	Temperatura Máxima 37°C
1	0.00	0.000	0.000
2	0.00	0.000	0.000
4	0.00	0.000	0.000
8	0.04	0.000	0.036
16	0.00	0.000	0.000
32	0.00	0.000	0.036
64	0.04	0.071	0.107
Total	**0.071**	**0.071**	**0.179**

Tabla No. 11. Porcentajes Totales de Buena Amplificación

Día	Porcentaje de Amplificación por Día	Porcentajes de Buena Amplificación		
		Temperatura Mínima 4°C	Temperatura Media Ambiente	Temperatura Máxima 37°C
		0.821	**0.536**	**0.35700**
1	**1.00**	1.642	1.072	0.714
2	**1.00**	1.642	1.072	0.714
4	**0.83**	1.368	0.893	0.595
8	**0.25**	0.411	0.268	0.179
16	**0.42**	0.684	0.447	0.298
32	**0.5**	0.821	0.536	0.357
64	**0**	0	0	0

Tabla No. 12. Probabilidades de Buena Amplificación.

Probabilidades de Amplificar una muestra de gradada relación Día-temperatura

Día	Temperatura Mínima 4°C	Temperatura Media Ambiente	Temperatura Máxima 37°C
1	62.15 %	51.74 %	41.66 %
2	62.15 %	51.74 %	41.66 %
4	57.78 %	47.18 %	37.30 %
8	29.10 %	21.14 %	15.15 %
16	40.62 %	30.88 %	22.93 %
32	45.09 %	34.90 %	26.31 %
64	0.00 %	0.00 %	0.00 %

Discusión

Al analizar muestras con manchas de sangre humana de una persona del sexo másculino y que han sido sometidas a factores de degradación como la temperatura y humedad, demostraron que pueden ser viables, o no viables para obtener un perfil genético de dientificación, concuerda según lo indicado por Jeffreys (1985), quien señala que los restos biológicos se encuentran en situaciones adversas cuando abandonan las condiciones controladas y estables del organismo, principalmente por las variables medio ambientales, temperatura y humedad, a la exposición a sustancias químicas o de microorganismos, hongos y bacterias, ocasionando la degradación del indicio o la inhibición de los análisis.

Por otro lado la extracción de ADN por el método de DNA IQ System, resinas magnéticas de la marca Promega demostró ser un método de extracción y purificación bastante adecuado para soportes de tela de algodón con manchas de sangre sometidas a diversas temperaturas como lo es a 4 °C, a temperatura ambiente y a 37 °C, logrando amplificaciónes en los días de exposición de 1/ 2/ 4/ 8/ 16/ 32/ 64 días de exposición.

Al valorar la amplificación de PCR del marcador genético Amelogenina (sexo biológico), se puede observar que cuando las muestra ha sido expuesta a más días sin importar a que temperatura se encuentre el porcentaje de amplificación disminuye. La baja amplificación se logro observar apartir de los días de exposición de 8/16/32/64. Se confirma que a menor tiempo de exposición mejor amplificación de la muestra, coincide con lo que señala Butler (2005), que la importancia propia de la recolección de evidencia con ADN no debe ser minimizada. Si la muestra de ADN está contaminada desde el principio, se obtiene información ambigua que se convierte en un reto importante en la investigación forense, pues puede llegar a comprometer los resultados.

En cuanto a la incidencia de amplificación efectiva para obtener un perfil completo, parcial o nulo de la muestra problema se realizaron cálculos estadísticos que indican que las muestras sometidas a una temperatura mínima de 4 °C son viables para obtener una buena amplificación con un porcentaje del 82 %, mientras que las muestras sometidas a temperatura ambiente arrojan un porcentaje de amplificación del 53.6 % y las sometidas a temperatura máxima de 37 °C presentan un porcentaje de amplificación de 35.7 %

Así mismo también se obtuvo un porcentaje del 107 % de media amplificación o amplificación parcial en las muestras sometidas a temperatura máxima 37 °C.

Las muestras que no amplificaron fueron las que se encontraron sometidas a temperatura máxima de 37 °C con un porcentaje de no amplificación del 179 %.

Es importante señalar que el presente estudio da las bases para comprender como influyen algunos factores ambientales en el proceso de degradación de las muestras biológicas de sangre que pueden encontrarse en un lugar de los hechos, motivo por el cual deberá de extenderse el estudio a más días de degradación y sumando más factores que puedan influir en la calidad de la muestra biológica. A pesar de que el objetivo principal del estudio no fue el análisis de las técnicas de extracción, éstas sirven de referencia para comprender el comportamiento de la degradación del ADN en las muestras sanguíneas.

Conclusiones

Los métodos de extracción de ADN por resinas quelantes llamadas Chelex y la extracción de ADN por el método de DNA IQ System, resinas magnéticas de la marca Promega son métodos de extracción útiles en el procesamiento de muestras de sangre degradada. La extracción con resinas quelantes llamadas Chelex demostró ser un método de extracción eficaz para soportes de tela de algodón con manchas de sangre sometidas a diversas temperaturas como lo es a 4 °C, a temperatura ambiente y a 37 °C, logrando amplificaciónes en los días de exposición de 1/ 2/ 4/ 8 días de exposición con un porcentaje por arriba del 66%. Se observó al secuenciar que el marcador genético Amelogenina (sexo biológico) es más fácil de visualizar su amplificación en una matriz de gel de poliacrilamida que en una matriz de gel de agarosa. Las muestras con manchas de sangre que se encuentren en una tela de algodón que se expusieron por más de ocho días sometidas a cualquier temperatura arrojarán una amplificación más baja. Como recomendación se resalta este tipo de trabajos para el impulso de la investigación, trabajos realmente que cumplen con el objeto de la ciencia. Se recomienda que se repita con otras variables como lo puede ser un lugar abierto, con otros soportes como es el suelo, paredes e incrementar el tiempo de exposición a 6 meses. De igual forma se recomienda realizar este experimento utilizando otros marcadores genéticos (STR) además de la Amelogenina, así como también la exposición a sustancias químicas.

Referencias bibliográficas

Butler, J.M. (2005). *Forensic DNA Typing*. España: Elsevier.

Guízar J.J. (2001). *Genética clínica: Diagnostico y manejo de las enfermedades hereditarias*. México: El manual Moderno.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316:76-79.

Penacino G. (2009). Recomendaciones de la Sociedad Latinoamericana De Genética Forense basadas en la *International Society forForensic Genetics* –ISFG- y en el GEP-SFG. Disponible en: www.slagf.org/toma.html.

PROMEGA (s.f.). *Manual del sistema Geneprint STR Systems*. S.P.: PROMEGA.

Tully G.,Bär W. , Brinkmann B., Carracedo A., Gill P., Parson W. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* (2001) 124: 83-91.

Reyes Calderón, José Adolfo (2005). *Tratado de Criminalística*. México: Cárdenas editor distribuidor.

_____ (1998) *Técnicas Criminalísticas para el fiscal*. Guatemala: Fiscalía General de la República de Guatemala.

_____ (2001). *La importancia de la identificación en la ciencia del Derecho*. Guatemala: Universidad Rafael Landívar.

_____ (2010). *Enciclopedia CCI. Criminalística, Criminología e Investigación*. México: Procuraduría General de México.

Rudin, N. (2002). *Forensic DNA Analysis*. EUA: CRC Press.