

Libros de **Cátedra**

Genética forense no-humana

Pilar Peral García
Guillermo Giovambattista
María Verónica Ripoli
(coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

GENÉTICA FORENSE NO-HUMANA

Pilar Peral García
Guillermo Giovambattista
María Verónica Ripoli
(coordinadores)

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS



2015

A nuestras familias:

A María Silvia, Santiago y Emilia;

A Carlos, Lucas, Alan, Julieta, Milagros y Lola;

A Adrián, María Belén y Tiziano.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP), a la Universidad Nacional de la Plata, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a los autores que han colaborado desinteresadamente para la concreción de este libro, a la Trad. L. Adriana Di Maggio por la colaboración en la edición del texto y a la Diseñadora en Comunicación Visual Lucia Featherston por el diseño de las imágenes.

ÍNDICE

Prólogo _____	5
Capítulo 1. Introducción a la Genética Forense No-Humana, <i>Guillermo Giovambattista Laura S. Barrientos y Pilar Peral García</i> _____	6
Capítulo 2. Abigeato: del lugar del hecho al laboratorio, <i>Nora Lía Padola, Analía Margheritis y Ana V. Bustamante</i> _____	32
Capítulo 3. Métodos de genotipificación, <i>Egle E. Villegas Castagnasso, Elina Francisco, Julián A. Crespi, Silvina Díaz, Claudia M. Corbi Botto y María V. Ripoli</i> _____	54
Capítulo 4. Bases de datos en genética forense, <i>Guillermo Giovambattista, Daniel Estanislao Goszczynski , María Elena Fernández, Juan Pedro Lirón y Pilar Peral García</i> _____	102
Capítulo 5. Bases estadísticas de la genética forense, <i>Juan Pedro Lirón, María Elena Fernández y Guillermo Giovambattista</i> _____	115
Capítulo 6. Asignación Racial, <i>Andrés Rogberg Muñoz, Agustín H. Falomir Lockhart y Daniel Goszczynski</i> _____	142
Capítulo 7. Identificación especie-específica en animales domésticos, <i>Diego Manuel Posik, Marcela Gonçalves Drummond, Lissandra Sousa Dalsecco, Danilo Alves Pimenta-Neto, Denise Aparecida Andrade de Oliveira y Guillermo Giovambattista</i> _____	163
Capítulo 8. Identificación especie-específica en tráfico de fauna silvestre, <i>María Eugenia D'Amato</i> _____	186
Capítulo 9. Identificación especie-específica en vegetales, <i>Rafael Melo Palhares, Marcela Gonçalves Drummond, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil, Denise Aparecida Andrade de Oliveira</i> _____	223
Capítulo 10. Legislación, certificación y acreditación de laboratorios, <i>Virginia Aliverti y Pilar Peral García</i> _____	240
Los autores _____	256

PRÓLOGO

El presente libro nace como producto de una convocatoria para Libros de Cátedra de la Universidad Nacional de la Plata. La propuesta, avalada por la Facultad de Ciencias Veterinarias, permitirá introducir al lector en los principales aspectos de la identificación genética de animales y/o sus productos derivados, conocer los principales métodos de genotipificación utilizados en genética forense, reconocer los lineamientos de estandarización y acreditación de los laboratorios de genética forense y por último fortalecer las capacidades de los futuros profesionales en el área de genética.

Entre los autores de esta obra se destacan profesionales de distintas entidades académicas: Universidades Nacionales (UNCPBA, UNLP), del exterior (Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil; Universidad de Western Cape Sudáfrica), laboratorios de servicios nacionales (Laboratorio de ADN, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, de la CICPBA y el CONICET); internacionales (Laboratório de Genética, Escola de Veterinária y el Myleus Biotechnology Research Team, Belo Horizonte, Brasil) y profesionales del Cuerpo de Instructores de la Fiscalía General del Departamento Judicial Azul y de Junín de la Provincia de Buenos Aires.

Los coordinadores del presente libro son profesionales responsables del dictado en la carrera de grado de Médico Veterinario de la UNLP, de un curso optativo de Genética Veterinaria Forense de la UNLP, y miembros del Servicio Externo de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, UNLP-CONICET).

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN A LA GENÉTICA FORENSE NO HUMANA

DEFINICIÓN E HISTORIA DE LA GENÉTICA FORENSE, ÁREAS DE
INCUMBENCIA, OBJETIVOS Y APLICACIONES

Guillermo Giovambattista, c, Pilar Peral García

1.1. Historia de la Genética Forense

La genética forense se define como la especialidad que engloba las aplicaciones de las técnicas de genética molecular basadas en el análisis de los polimorfismos del ADN y en la identificación de individuos, razas o especies con el fin de auxiliar a la justicia en la resolución de casos judiciales.

El origen de la genética se remonta a los estudios de Mendel publicados en el año 1866. Desde ese hito inicial, una serie de eventos como el desarrollo de los primeros marcadores genéticos, los mapas de ligamiento, la teoría de la genética de poblaciones, entre otros (Roewer, 2014), fueron cimentando las bases de esta disciplina en las últimas tres décadas, permitiendo el surgimiento de la genética forense (Figura 1.1).

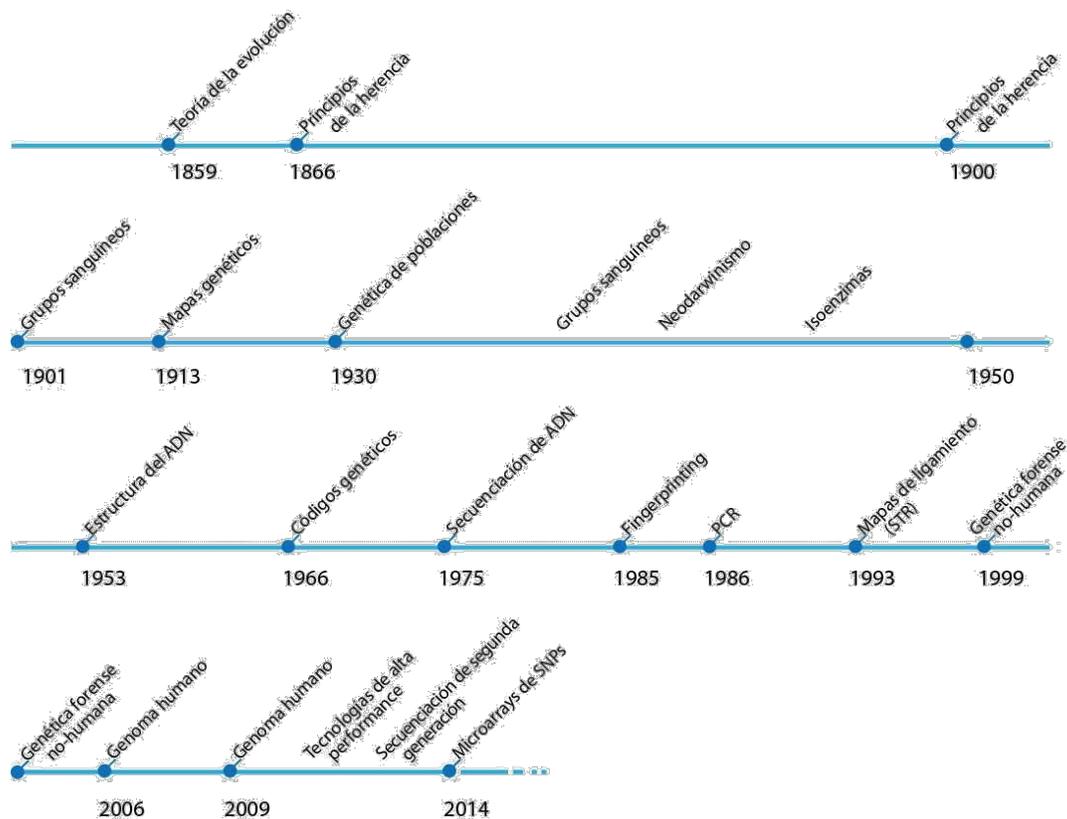


Figura 1.1: Cronología de los principales hitos en el desarrollo de la genética.

Inicialmente, los estudios de identificación genética y la resolución de filiaciones se realizaban a través de la tipificación de grupos sanguíneos, de genes del sistema principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) y de polimorfismos bioquímicos o isoenzimas (Ripoli y Villegas Castagnasso, 2010). Estas técnicas se basan en el análisis de las variaciones a nivel proteico mediante geles de electroforesis o reacciones serológicas e inmunológicas, por lo que su uso se limitaba al estudio de polimorfismos que producen cambios no sinónimos en las proteínas y a partir del análisis de muestras frescas de unos pocos tipos de tejidos, como por ejemplo la sangre. Sin embargo, a partir de la década del '50 del siglo XX, con la descripción de la estructura del ADN y el descubrimiento del código genético y con el desarrollo de las técnicas de biología molecular (secuenciación del ADN,

enzimas de restricción, técnicas de hibridación) comenzaron a sentarse las bases para el surgimiento de la genética forense.

En 1985, Sir Alec John Jeffreys, genetista británico de la Universidad de Leicester, descubrió un patrón de variable y heredable basado en el análisis del ADN mediante sondas multi-locus del tipo minisatélites, lo que permitió desarrollar la técnica de las huella genéticas de ADN (*DNA fingerprinting*; Figura 1.2) (Jeffreys et al., 1985; Kirby, 1990). Esta metodología permitió por primera vez determinar los perfiles de ADN de un individuo o de una muestra biológica. Por lo tanto, la huella digital (*forensic genetic fingerprinting*) puede definirse como “la comparación del ADN nuclear de una persona con aquel identificado en una muestra biológica encontrada en la escena del crimen o con el ADN de otra persona con el propósito de realizar una identificación o una exclusión” (Roewer, 2014).



Figura 1.2: Fotografía de la primera huella genética de Sir Alec John Jeffreys expuesta en el Museo de Ciencias de Londres, Reino Unido

La primera aplicación de esta metodología consistió en la identificación de los parientes residentes en el Reino Unido de un menor en un caso de inmigración ilegal. Los resultados obtenidos permitieron

evitar la deportación del menor (Jeffreys et al., 1985). En el año 1987, la técnica de la huella genética se utilizó por primera vez como técnica forense policial para identificar al violador y asesino de dos jóvenes británicas, Lynda Mann y Dawn Ashworth, que habían sido asesinadas en la ciudad de Narborough (Leicestershire, Reino Unido) en los años 1983 y 1986, respectivamente (Cuadro 1.1). La resolución de este caso puso en evidencia la gran potencialidad de los métodos de identificación genética basados en el análisis del ADN. La tecnología de la huella genética fue rápidamente aplicada a la identificación de otros organismos, incluyendo plantas y hongos (Nybom et al., 2014). En este contexto, los animales domésticos no fueron la excepción (Jeffreys et al., 1987). A pesar de que la técnica desarrollada por Jeffreys fue aplicada con éxito hasta mediados de los '90 para resolver casos forenses y de filiación, ésta presentaba varias limitaciones en cuanto a la cantidad y la calidad del ADN requerido, a la repetitividad y la estandarización y al análisis estadístico de los resultados (Ripoli y Villegas Castagnasso, 2010; Roewer, 2014).

En los años sucesivos, otros desarrollos tecnológicos en el área de la biología molecular (por ejemplo, la aplicación de la tecnología de electroforesis capilar a la secuenciación del ADN y la mejora de los métodos de purificación de ADN a partir de diferentes tipos de muestras y estados de conservación) y en otras disciplinas como la informática y la genética de poblaciones aplicada a las ciencias forenses (*ver capítulos 3, 5 y 6*) fueron cimentando las bases para la consolidación de la genética forense. Sin embargo, el hito que marcó un cambio radical en las posibilidades reales de aplicación de las ciencias forenses fue el desarrollo que realizó Kary Mullis en 1985: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polimerase chain reaction*). Esta metodología permite la amplificación de cientos de miles de copias de ADN a partir de una secuencia molde específica (*target*) limitada por un par de oligonucleótidos (*primers*). Aunque las primeras versiones de la PCR resultaron poco eficaces, el uso de polimerasas de ADN

termoestables extraídas de microorganismos hemofílicos, como por ejemplo la Taq polimerasa, permitió su uso masivo.

Finalmente, el uso de la PCR para amplificar secuencias repetidas en tándem del tipo microsatélites (STRs, del inglés *short tandem repeat*) (Goldstein y Schlötterer, 1999) y la posterior separación de los fragmentos (alelos) mediante secuenciadores capilares (originalmente en geles de poliacrilamida) permitió el desarrollo de los actuales métodos de identificación genética y la asignación racial, mientras que la amplificación y secuenciación de fragmentos de ADN correspondientes principalmente a genes mitocondriales es la base de los métodos usualmente empleados para la identificación de especies (*ver capítulos 3, 7, 8 y 9*).

En las tres últimas décadas, las metodologías antes mencionadas se han usado extensivamente en todo el mundo en el área de las ciencias forenses para asistir en el trabajo de los fiscales y policías y de esta forma aportar evidencias para resolver casos judiciales. La genética forense se aplicó inicialmente a la resolución de *casos humanos*, donde tanto la víctima como el sospechoso eran de esta especie. Así por ejemplo, pueden mencionarse casos de paternidades, asesinatos, violaciones, inmigración ilegal, catástrofes naturales, desaparición de personas, atentados terroristas y guerras (Roewer, 2014). La disponibilidad de técnicas sensibles y precisas de biología molecular ha permitido el análisis de restos orgánicos como pelos, semen, saliva y sangre, secuestrados en las escenas de un crimen, delito sexual o catástrofe. Por esta razón, cuando se piensa en genética forense se la asocia a la resolución de este tipo de casos. Sin embargo, esta situación ha comenzado a cambiar en los últimos quince años con el surgimiento de una nueva disciplina denominada *genética forense no humana*, la que se describirá a lo largo del presente libro.

1.2. Genética Forense No Humana

Los primeros casos forenses que involucraron muestras biológicas no humanas surgen ante la necesidad de resolver casos donde las víctimas eran humanos, como por ejemplo ataques de animales a personas, accidentes de autos que involucraban animales, o asesinatos (Menotti-Raymond et al., 1997; Savolainen y Lundeberg, 1999; Schneider et al., 1999; Halverson y Basten, 2005; Nussbaumer y Korschineck, 2006; Ogden et al., 2009). Se han utilizado evidencias provenientes de las mascotas de las víctimas o de los sospechosos para resolver casos judiciales humanos y de esta forma condenar o absolver al acusado (Figura 1.2). En 1999, Savolainen y Lundeberg reportaron seis casos forenses que incluían tres asesinados, un asalto a banco, un robo y un caso de caza furtiva, donde las evidencias consistían en restos de pelos presuntamente originados en perros y/o lobos. El ADN procedente de los bulbos pilosos fue analizado mediante la secuenciación de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial (ADNmt). Los resultados obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en las base de datos establecidas para las poblaciones de perros y lobos. Dichas comparaciones permitieron la exclusión de los ocho sospechosos de los casos de asesinatos. Sin embargo, las evidencias permitieron vincular dos de los asesinatos, ya que compartían la misma secuencia rara de ADNmt, característica de una raza de perros. En el caso de robo y en el asalto del banco se pudo establecer un vínculo entre las muestras biológicas y los sospechosos. Finalmente, en el caso de caza furtiva, se pudo establecer que los pelos provenían de un perro y no un lobo. Los estudios demostraron que el análisis genético de muestras de origen animal es una valiosa herramienta para las investigaciones forenses.

En los últimos años la disciplina ha evolucionado independientemente de la genética humana con el fin de resolver casos donde el objeto de estudio es un animal o un vegetal. Es por esta razón que la *genética forense animal*, *vegetal* o en forma más genérica *genética forense no humana* es una nueva disciplina que puede ser definida como “la

aplicación de técnicas y teorías genéticas en asuntos legales que involucran materiales biológicos de origen animal o vegetal” (Animal Forensic Workshop, ISAG Conference 2008, Amsterdam, The Netherlands, http://www.isag.us/Docs/Proceedings/ISAG_Proceedings_2008.pdf). Esta área del conocimiento provee perfiles de ADN que permiten relacionar al sospecho, la víctima y la escena del crimen, en los cuales el animal puede haber sido la víctima (casos de crueldad animal, robo de animales, tráfico ilegal de fauna silvestre), el culpable (animales involucrados en ataques a personas u otro animal, causantes de accidentes, responsables de daños a propiedades) o el testigo (muestras de ADN de origen animal pueden relacionar al sospechoso con la escena del crimen o con la víctima) (Giovambattista et al., 2001; Lirón et al., 2007; Díaz et al., 2007; Himmelberger et al., 2008; van de Goor et al., 2009; Grahn et al., 2010; Di Rocco et al., 2011; Frosch et al., 2011; Ogden et al., 2012; Wictum et al., 2012). Los resultados del análisis de microsatélites de muestras biológicas se han presentado en los Juzgados como evidencias en casos que involucraban animales domésticos, tales como bovinos, ovejas, cabras, caballos y llamas (<http://www.vgl.ucdavis.edu/forensics/index.php>).

La Argentina fue pionera en el desarrollo de la genética forense animal. En 1990, el grupo de genética de animales domésticos del Instituto de Genética Veterinaria (IGEVEVET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata) resolvió para el Poder Judicial de la Provincia de Buenos Aires el primer caso de genética forense animal, que consistió en la resolución de un caso de robo de ganado o abigeato (Giovambattista et al., 2001). Desde esa fecha se han resuelto en el país varios centenares de casos judiciales que involucraban muestras de origen animal: robo de ganado y mascotas, adulteración de alimentos, fauna ilegal y dopaje de caballos (Lirón et al., 2007; Díaz et al., 2008; Di Rocco et al., 2011). En la actualidad, existe una red de laboratorios compuesta por las Facultades de Ciencias Veterinarias de las Universidades Nacionales de La Plata, del Centro de

la Provincia de Buenos Aires y de La Pampa, dedicadas a la resolución de casos de genética forense animal, como así también el laboratorio de Genética Aplicada de la Sociedad Rural Argentina (SRA). Estos casos han tenido una alta visibilidad social en el país (Figura 1.3).



Figura 1.3: Visibilidad social de la genética forense animal en la Argentina.

Debido al surgimiento de la genética forense no humana y el posterior crecimiento del número de laboratorios especializados en esta disciplina, comenzaron a publicarse artículos sobre esta temática en diferentes revistas periódicas de ciencias forense y medicina legal (Tabla 1.1; <http://www.forensicswiki.org/wiki/Journals>), así como también libros especializados en genética forense animal (van de Goor, 2011; Merck, 2012; Linacre y Tobe, 2013; Rivers y Dahlem, 2014) o vegetal (Hall y Byrd, 2012).

Tabla 1.1. Lista de las principales revistas dedicadas a las ciencias forenses.

Nombre	Asociación	Editorial	Web
Forensic Science International		Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international/
Forensic Science International Supplement Series		Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international-supplement-series
Forensic Science International: Genetics	ISFG	Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international-genetics
Forensic Science International: Genetics Supplement Series	ISFG	Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international-genetics-supplement-series
Journal of Forensic Sciences	American Academy of Forensic Sciences	Wiley	http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1556-4029
Legal Medicine	Japanese Society of Legal Medicine	Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/legal-medicine
Investigative Genetics		BioMed Central	http://www.investigativegenetics.com/
Journal of Forensic and Legal Medicine		Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/journal-of-forensic-and-legal-medicine
Science & Justice	Journal of the Forensic Science Society	Elsevier	http://www.journals.elsevier.com/science-and-justice
Journal of Forensic Research		OMICS Publishing Group	http://www.omicsonline.org/forensic-research.php
Journal of Forensic Science & Criminology		Annex Publishers	http://www.annexpublishers.com/journals/journal-of-forensic-science-and-criminology/jhome.php
Problems Of Forensic Sciences		Instytut Ekspertyz Sądowych	http://www.forensicscienc.e.pl/content/view/8/14/lan_g,en/
Australian Journal of Forensic Sciences	Australian Academy of Forensic Sciences	Taylor & Francis	http://www.tandfonline.com/toc/tajf20/current#.U5qyfvQWo8o

Una de las consecuencias del crecimiento de la genética forense no humana fue la aparición de cursos de especialización en instituciones académicas como respuesta a la necesidad de formar recursos humanos. En el anexo se mencionan algunos ejemplos de la amplia oferta de cursos sobre genética forense que se dictan en distintas instituciones académicas.

Simultáneamente, se organizan talleres de discusión sobre genética forense no humana en reuniones científicas de diferentes asociaciones científicas internacionales, como la Asociación Internacional para la Genética Animal (ISAG, <http://www.isag.us/>) y la Sociedad Internacional de Ciencias Forenses (ISFG, <http://www.isfg.org/>), y en sociedades locales, como la Sociedad Argentina de Genética Forense (SAGF, <http://www.sagf.org.ar/>). En estas reuniones se discuten diferentes temas de interés para la genética forense no humana, tales como el desarrollo y mejoramiento de los métodos de genotipificación, el desarrollo de bases de datos para los diferentes tipos de marcadores en diferentes especies, la descripción de casos de aplicación, los mecanismos de colaboración inter-laboratorio (*Proficiency test* vs. *Comparison test*) y las recomendaciones para la estandarización de laboratorios dedicados a la genética forense no humana (acreditación/certificación). Con respecto a los dos últimos puntos, no se puede dejar de mencionar los esfuerzos realizados con el fin de proponer listas de recomendaciones para los laboratorios dedicados a la genética forense animal (Budowle et al., 2005), así como la validación de los métodos de genotipificación y la estandarización de las nomenclaturas (Van de Goor et al., 2009; Wictum et al., 2012). En la Tabla 1.2 se detallan los principales talleres sobre genética forense no humana realizados hasta el momento.

Tabla 1.2. Lista de talleres sobre genética forense no humana.

Taller	Asociación	Lugar/fecha	Web
22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics	ISFG	Copenhague, Dinamarca, 2007.	http://www.isfg.org/Meeting
23rd Congress of the International Society for Forensic Genetics	ISFG	Buenos Aires, Argentina. 2013	http://www.isfg.org/Meeting
24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics	ISFG	Viena, Austria. 2011	http://www.isfg.org/Meeting
25th Congress of the International Society for Forensic Genetics.	ISFG	Melbourne, Australia, 2013	http://www.isfg.org/Meeting
Primer Workshop sobre Genética Forense No-Humana	ISAG	Porto Seguro, Brasil, 2008	http://www.isag.us/conferences_past.asp
Segundo Workshop sobre Genética Forense No-Humana	ISAG	Amsterdam. Países Bajos, 2008.	http://www.isag.us/conferences_past.asp
Tercer Workshop sobre Genética Forense No-Humana	ISAG	Edimburgo, Escocia. 2010.	http://www.isag.us/conferences_past.asp
Cuarto Workshop sobre Genética Forense No-Humana	ISAG	Cairns, Australia, 2012	http://www.isag.us/conferences_past.asp
SWFS 2012 meeting	SWFS	Jackson Lake Lodge near Jackson, WY, USA 2012	http://www.wildlifeforensicscience.org/

Otra consecuencia del desarrollo de la genética forense no humana fue la necesidad de la implementación de bases de datos poblacionales para las diferentes especies domésticas o especies silvestres, información imprescindible para la estimación de los índices forenses, la interpretación de los resultados y la redacción de los informes (Halverson y Basten, 2005; Himmelberger et al., 2008; Grahn et al., 2011; Kanthaswamy et al.2009; para más detalle ver capítulo 4). En la Argentina, en el marco del Programa Provincial de Identificación Genética para la Prevención y Resolución de Casos de Abigeato en Ganado Mayor (Bovinos y Equinos), en el Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET, CCT-CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata) se implementó una base de datos genéticos para las principales razas de animales de producción (bovinos, equinos, ovinos) y de compañía (perros) para ser usada en la resolución de casos forenses.

1.3. Perspectivas Futuras de la Genética Forense

Como se mencionó anteriormente, los cambios tecnológicos significativos ocurridos en los últimos años han modificado radicalmente el enfoque de los estudios en la mayoría de las ciencias biológicas, migrando los trabajos del análisis de uno o unos pocos genes a los estudios genómicos. Como era de esperar, las ciencias forenses no han sido ajenas a estos cambios tecnológicos y conceptuales. En su momento, la tecnología de Jeffreys significó un importante desarrollo y el puntapié inicial para la genética forense. Sin embargo, la evolución tecnológica la tornó obsoleta para los usos forenses y se pasó del *Southern blot* a la PCR, de la marcas radiactivas a las fluorescentes y de la electroforesis en geles a la electroforesis capilar. Como las técnicas se hicieron más sensibles, automatizables y con mayor repetitividad y los métodos estadísticos se hicieron más potentes, la genética forense

se expandió en numerosos laboratorios de todo el mundo, ampliándose significativamente el campo de aplicación.

Ante los continuos cambios tecnológicos, la comunidad de genética forense usualmente se pregunta en qué dirección se desarrollará la huella genética (Budowle y van Daal, 2009; Kayser y de Knijff, 2011). Mientras que la determinación de la huella genética basado en minisatélites es el pasado, los microsatélites y la secuenciación capilar son el presente, con los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, del inglés *simple nucleotide polymorphism*), las inserciones y supresiones (INDELs, del inglés *insertions and deletions*) y las tecnologías de microarreglos (*microarrays*) y de secuenciación masiva de segunda generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) estamos adentrándonos en el futuro. Un número creciente de investigadores del área están convencidos que los métodos que utilizan NGS reemplazarán en un futuro cercano a aquéllos basados en análisis de fragmentos (microsatélites). Con el surgimiento de las tecnologías de NGS es posible ampliar significativamente los alcances de la genética forense, ya que, por ejemplo, será posible analizar rápida y económicamente un enorme número de loci informativos (Parson et al., 2013; Roewer, 2014).

En la actualidad, podemos definir cuatro tipos de juegos de polimorfismos desde el punto de vista forense: i. un juego de 12-30 STRs autosómicos estandarizado a nivel internacional; ii. un panel de marcadores del cromosoma Y altamente informativos; iii. polimorfismos de la región control y de regiones codificantes del ADNmt; y iv. SNPs autosómicos que permitan inferencias fenotípicas (Budowle y van Daal, 2008; Roewer, 2014). Recientemente se ha planteado la posibilidad de tipificar los paneles de STRs mediante NGS (Bornman et al., 2012; Warshauer et al., 2013). Por otra parte, Allen et al. (2013) desarrollaron una metodología basada en NGS que permite tipificar simultáneamente estos cuatro tipos de marcadores genéticos: 10 STRs, 386 SNPs marcadores autosomales para determinar ancestría y características

fenotípicas, y el genoma completo del ADNmt. Sin embargo, a pesar de lo promisorio de las técnicas de NGS, éstas aún presentan una tasa de error demasiado elevada para el trabajo rutinario en genética forense (Bandelt y Salas, 2012), aunque es de esperar que estas tecnologías mejoren su precisión y consistencia en el corto plazo.

Una pregunta que ha surgido con la posibilidad de tipificar simultáneamente un número grande de SNPs de regiones codificantes es ¿Con qué precisión se podría predecir la apariencia de un individuo a través del análisis del ADN? Diferentes autores han realizado identikit moleculares mediante el estudio de genes relacionados a pigmentación, ancestría, entre otros, con resultados promisorios (Kayseremail y Schneideremail 2009; Walsh et al., 2011; Walsh, 2013).

Otra área donde las nuevas tecnologías seguramente tendrán un impacto significativo es en el control de alimentos para la detección de contaminaciones y adulteraciones. Proyectos internacionales como el *International Barcode of Life* (iBOL; <http://ibol.org/>) han tenido derivaciones hacia su aplicación en genética forense (Dawnay et al., 2007; Carvalho et al., 2011; Dalton et al. 2011; Haye et al., 2012; Galimberti et al., 2013), existiendo un incremento en el monitoreo de los puntos de ventas para verificar la sustitución de productos comestibles (Wong y Hanner, 2008; Miller y Mariani, 2010) o medicinales (Wallace et al., 2012). En este sentido, organizaciones como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) ya han desarrollado normativas para la identificación de especies acuáticas con el fin de garantizar la seguridad alimenticia (<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/DNASeafoodIdentification/>). En este contexto, las nuevas tecnologías de NGS tendrán un importante papel, especialmente para la determinación de la composición de productos mezclas (por ejemplo, alimento con mezclas como dulces, paté).

Otro tema de discusión es la reducción del tiempo que llevan los análisis genéticos para determinar un perfil de ADN, factor esencial en

las investigaciones policiales. Ya existen instrumentos comerciales que producen en sólo dos horas un perfil de ADN comparable a los almacenados en las bases de datos. Estos equipos se encuentran actualmente en estado de validación (Tan et al., 2013) y cambiarán en el futuro la forma en que se obtiene y analiza el ADN, ya que a partir de un hisopado pueden brindar un perfil de ADN, realizando la extracción, amplificación, separación, detección y lectura (*allele calling*) totalmente automática y sin intervención humana. Esto permitirá la rápida identificación de personas o animales que se encuentren en bases de datos. Sin embargo, y a modo de comentario final, no se tienen que olvidar los beneficios y costos sociales que tendrá la aplicación de las nuevas tecnologías emergentes (Levitt, 2007).

1.4. Acerca del presente libro

A lo largo de los diferentes capítulos del presente libro se hará un recorrido por las diferentes áreas del conocimiento involucradas en la genética forense en general y la genética forense no humana en particular, todas piezas necesarias para la resolución de un caso forense y la posterior redacción e interpretación correcta de los resultados obtenidos. Así, por ejemplo, se abordarán desde el relevamiento de las muestras en el lugar del hecho y las evidencias secuestradas en poder de los sospechosos (Capítulo 2) – primer paso indispensable para la correcta resolución de un caso judicial – pasando posteriormente por la descripción de los métodos de análisis de ADN (Capítulo 3), las bases de datos genéticos (Capítulo 4) y los métodos estadístico poblacionales (Capítulos 5 y 6) más comúnmente empleados en los estudios forenses. Por otra parte, se describe el estado del arte de la genética forense no humana a diferentes niveles de organización (individuo, población/raza y especie), haciendo hincapié en los ejemplos de aplicación para resolver casos forenses animales y vegetales (Capítulos 7, 8 y 9). Finalmente, se discutirán las normas de acreditación y certificación de los laboratorios

genéticos, necesarias para garantizar la calidad y repetitividad de los resultados obtenidos (Capítulo 10).

1.5. Referencias Bibliográficas

Allen, M., Nilsson, M., Havsjö, M., Edwinsson, L., Granemo, J., Bjerke, M., (2013) “Haloplex and MiSeq NGS for simultaneous analysis of 10 STRs, 386 SNPs and the complete mtDNA genome”. 25th Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de septiembre de 2013, Melbourne.

Bandelt, H.J., Salas, A., (2012) “Current next generation sequencing technology may not meet forensic standards” en *Forensic Sci Int Genet*. Número 6, pp. 143–145.

Bornman, D.M., Hester, M.E., Schuetter, J.M., Kasoji, M.D., Minard-Smith, A., et al. (2012) “Short-read, high-throughput sequencing technology for STR genotyping” en *Biotechniques*, pp. 1–6.

Brauner, P., Reshef, A., Gorski, A., (2001) “DNA Profiling of Trace Evidence—Mitigating Evidence in a Dog Biting Case” en *J Forensic Sci*. Número 46(5), pp. 1232-1234.

Budowle, B. and Van Daal, A., (2009) “Extracting evidence from forensic DNA analysis: future molecular biology directions” en *Biotechniques*. Número 46, pp. 342–350.

Budowle, B., Garofano, P., Hellmann, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parsons, W., et al., (2005) “Recommendations for animal DNA forensic identity testing” en *Int J Legal Med*. Número 119(5), pp. 295–302.

Budowle, B., Van Daal, A., (2008) “Forensically relevant SNP classes” en *Biotechniques*. Número 44, pp. 603–608.

Carvalho, D.C., Neto, D.A., Brasil, B.S., Oliveira, D.A., (2011) “DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil” en *Mitochondrial DNA*. Número 1, pp. 97-105.

Dalton, D.L., Kotze, A., (2011) "DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa" en *Forensic Science International*. Número 207, pp. 1-3, pp. 51–54.

Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G.R., Thorpe, R.S., (2007) "Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification" en *Forensic Science International*. Número 173, pp. 1–6.

Di Rocco, F., Posik, D.M., Ripoli, M.V., Díaz, S., Maté, M.L., Giovambattista, G., Vidal-Rioja, L., (2011) "South American Camelid Illegal Traffic Detection by Means of Molecular Markers" en *Legal Medicine*. Número 13, pp. 289-292.

Díaz, S., Kienast, M.E., Villegas-Castagnasso, E.E., Pena, N.L., Manganare, M.M., Posik, D.M., Peral-García, P., Giovambattista, G., (2008) "Substitution of Human for Horse Urine Disproves an Accusation of Doping" en *Journal of Forensic Science*. Número 53, pp. 1145-1148.

Frosch, C., Dutsov, A., Georgiev, G., Carsten Nowak, (2011) "Case report of a fatal bear attack documented by forensic wildlife genetics" en *Forensic Science International: Genetics*. Número 5, pp. 342–344.

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., Labra, M., (2013) "DNA barcoding as a new tool for food traceability" en *Food Research International*. Número 50, pp. 55–63.

Giovambattista, G., Ripoli, M.V., Lirón, J.P., Villegas-Castagnasso, E.E., Peral García, P., Lojo, M.M., (2001) "DNA typing in a cattle stealing case" en *Journal of Forensic Sciences*. Número 46, pp. 1484-1486.

Goldstein, D.B., Schlötterer, C., (1999) "Microsatellites, Evolution and Applications" en *Oxford University Press*, pp. 352.

Grahn, R.A., Kurushima, J.D. , Billings, N.C., Grahn, J.C., Halverson, J.L., Hammera, E., Ho, C.K., Kun, T.J., Levy, J.K., Lipinski, M.J., Mwenda, J.M., Ozpinar, H., Schuster, R.K., Shoorijeh, S.J., Tarditi, C.R., Waly, N.E., Wictum, E.J., Lyons, L.A., (2011) "Feline non-repetitive mitochondrial DNA control region database for forensic evidence" en *Forensic Sci Int Genet*. Número 5(1), pp 33-42.

- Hall, D.W. y Byrd, J., (2012), "Forensic Botany: A Practical Guide" en *Wiley-Blackwell*, ISBN: 978-0-470-66409-4
- Halverson, J., Basten, C.A., (2005) "PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs" en *Journal of Forensic Science*, Número 50, pp. 1–12.
- Hanner, R., Becker, S., Ivanova, N.V., Steinke, D., (2011) "FISH-BOL and seafood identification: geographically dispersed case studies reveal systemic market substitution across Canada" en *Mitochondrial DNA*. Suplemento 1, pp. 106-22.
- Haye, P.A., Segovia, N.I., Vera, R., Gallardo, M.Á., Gallardo-Escárate, C., (2012) "Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA Barcoding" en *Food Control*. Número 25, pp. 239-244.
- Himmelberger, A.L., Spear, T.F., Satkoski, J.A., George, D.A., Garnica, W.T., Malladi, V.S., Smith, D.G., Webb, K.M., Allard, M.W., Kanthaswamy, S., (2008) "Forensic utility of the mitochondrial hypervariable region 1 of domestic dogs, in conjunction with breed and geographic information" en *Journal of Forensic Science*. Número 53(1), pp. 81-9.
- Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F.Y., Semeonoff, R., (1985) "Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints" en *Nature*. Número 317, pp. 818-819.
- Jeffreys, A.J., Morton, D.B., (1987) "DNA fingerprinting of dogs and cats" en *Animal Genetic*. Número 18, pp. 1–15.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985) "Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA" en *Nature*. Número 314, pp. 67–73.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., (1985) "Individual-specific 'fingerprints' in human DNA" en *Nature*. Número 316, pp. 76–79.
- Kanthaswamy, S., Tom, B.K., Mattila, A.M., Johnston, E., Dayton, M., Kinaga, J., Erickson, B.J., Halverson, J., Fantin, D., DeNise, S., Kou, A., Malladi, V., Satkoski, J., Budowle, B., Smith, D.G., Koskinen, M.T., (2009) "Canine population data generated from a multiplex STR kit for

use in forensic casework” en *Journal of Forensic Science*. Número 54(4), pp. 829-40.

Kayser, M. and de Knijff, P. (2011) “Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology” en *Nat Rev Genet*. Número 12, pp. 179–192.

Kayser, M., Schneider, P.M., (2009) “DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: Motivations, scientific challenges, and ethical considerations” en *Forensic Science International: Genetics*. Número 3(3), pp. 154-161.

Kirby, L.T. (1990) “DNA Fingerprinting. An introduction” en *Stockton press New York, NY, USA*.

Levitt, M., (2007) “Forensic databases: benefits and ethical and social costs” en *Br Med Bull*. Número 83, pp. 235–248.

Linacre, A., y Tobe, S., (2013) *Wildlife DNA Analysis: Applications in Forensic Science*. Wiley-Blackwell. 350 pages ISBN: 978-0-470-66595-4.

Liron, J.P., Ripoli, M.V., Peral-García, P., Giovambattista, G. (2007) “Implication of population structure in the resolution of cattle stealing cases” en *Journal of Forensic Science*. Número 52(5), pp.1077-81.

Menotti-Raymond, M., Davis, V., O’Brian, S., (1997) “Pet cat hair implicates murder suspect” en *Nature*. Número 386, pp. 774.

Merck, M.D., (ed), (2012) *Veterinary Forensics: Animal Cruelty Investigations*. 2nd Edition, Wiley-Blackwell, 424 pages. ISBN: 978-0-470-96162-9.

Miller, D.D., Mariani, S., (2010) “Smoke, mirrors and mislabeled cod: poor transparency in the European seafood industry” en *Front.Ecol.Environ*. Número 8(19), pp. 517-521.

Nussbaumer, C., Korschineck, I., (2006) “Non-human mtDNA helps to exculpate a suspect in a homicide case” en *International Congress Series* 1288, pp.136 – 138.

Nybom, H., Weising, K., Rotter, B., (2014) “DNA fingerprinting in botany: past, present, future” en *Investigative Genetics*, Número 5, pp. 1.

- Ogden, R., Heap, E., Mc Ewing, R., (2009) "Advances in the DNA analysis of canine trace evidence for serious crime investigation in the UK" en *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. Número 2, pp. 290–291.
- Parson, W., Strobl, C., Strobl, C., Huber, G., Zimmermann, B., Gomes, S.M., Souto, L., Fendt, L., Delport, R., Langit, R., Wootton, S., Lagacé, R., Irwin, J. (2013) "Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)" en *Forensic Science Int Genet*. Número 7, pp. 632–639.
- Ripoli, M.V., Villegas Castagnasso, E.E., (2010) "Capítulo 1. Marcadores Genéticos" en *Genética de Animales domésticos* Ed Giovambattista G, P Peral García. Inter-médica, Buenos Aires, Argentina.
- Rivers, D.B., y Dahlem, G.A., (2014) *The Science of Forensic Entomology*. Wiley-Blackwell 400 pages ISBN: 978-1-119-94037-1
- Roewer, L., (2014) "DNA fingerprinting in forensics: past, present, future" en *Investigative Genetics*. Número 4, pp. 22.
- Savolainen, P., Lundeberg, J., (1999) "Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs" en *Journal of Forensic Sciences*. Número 44(1), pp. 77-81.
- Schneider, P.M., Seo, Y., Rittner, C., (1999) "Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident" en *International Journal of Legal Medicine*. Número 112, pp.315–6.
- Tan, E., Turingan, R.S., Hogan, C., Vasantgadkar, S., Palombo, L., Schumm, J.W., Selden, R.F., (2013) "Fully integrated, fully automated generation of short tandem repeat profiles" en *Investigative Genetic*. Número 4, pp. 16.
- Van de Goor, L.H.P., (2011) *Bovine and Equine Forensic DNA Analysis*. 141 pages. Utrecht University, ISBN 978-90-9026359-5.
- Van de Goor, L.H., Panneman, H. and van Haeringen, W.A., (2009) "A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci" en *Animal Genetic*. Número 41, pp. 122-127.

- Wallace, L.J., Boilard, S.M.A.L., Eagle, S.H.C., Spall, J.L., Shokralla, S., Hajibabaei, M., (2012) "DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of Natural Health Products" en *Food Research International*. Número 49, pp. 446–452.
- Walsh, S., (2013) "DNA Phenotyping: The prediction of human pigmentation traits from genetic data" en *Erasmus University Rotterdam*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/1765/40312>
- Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K.N., van Oven, M., Lao, O., Kayser, M., (2011) "IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information" en *Forensic Science International: Genetics*. Número 5(3), pp. 170–180.
- Warshauer, D.H., Lin, D., Hari, K., Jain, R., Davis, C., et al., (2013) "STRait Razor: A length-based forensic STR allele-calling tool for use with second generation sequencing data" en *Forensic Science International: Genetic*. Número 7, pp. 409–417.
- Wictum, E., Kun, T., Lindquist, C., Malvick, J., Vankan, D., Sacks, B., (2012) "Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework" en *Forensic Science International*. Número 23.
- Wong, E.H.-K., Hanner, R.H., (2008) "DNA barcoding detects market substitution in North American seafood" en *Food Research International*. Número 41(8), pp. 828–837.

1.6. ANEXO

Lista de Cursos sobre Genética Forense No Humana que se dictan en diferentes instituciones académicas

Genética Veterinaria Forense, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina (<http://www.fcv.unlp.edu.ar/>).

Cursos Medicina Forense Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (<http://www.vet.unicen.edu.ar/>).

Forensic and Conservation Genetics, University of Central Lancashire, Preston, Reino Unido (http://www.uclan.ac.uk/courses/msc_pgdipl_pgcert_forensic_and_conservation_genetics.php).

Animal Forensic, Animal Network, Fitzroy, Vic Australia (<http://www.animalforensics.com.au/course.php>).

Veterinary Forensics, College of Medicine and Veterinary Medicine, The University of Florida, Florida, USA (<http://forensics.med.ufl.edu/distance-education/veterinary-forensics-online/>).

Application of Forensic Science to Animal Cruelty, Cummings School of Veterinary Sciences, Tufts University, MA USA. (http://vet.tufts.edu/capp/animal_matters/2011_lectures.html).

Lista de Laboratorios que trabajan en genética forense animal

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), CCT CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina (http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?id=21075&info_general=yes&inst=yes).

Laboratorio de ADN, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

Dra. Adrian Linacre, School of Biological Sciences, Flinders University, Adelaide, South Australia, Australia (<http://www.swansea.ac.uk/undergraduate/courses/medicine/bscgenetics/>).

Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos (<http://www.uu.nl/faculty/veterinarymedicine>).

Laboratorio de Genética Aplicada, Sociedad Rural Argentina (SRA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Laboratorio de Genética Animal de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Laboratorio Van Haeringen Laboratorium BV (VHL), Ámsterdam, Países Bajos (<https://www.vhlgenetics.com/en-us/home.aspx>).

Laboratorio VGL Forensics, Davis, California, USA. (<http://www.vgl.ucdavis.edu/forensics/>).

Forensic DNA Lab., Department of Biotechnology, University of the Western Cape, Cape Town, South África (<http://www.forensicdnalab.org.za/>).

Weatherbys Ireland DNA Laboratory, Irlanda (http://www.irish-equine-centre.ie/index.php?item_id=59).

Laboratorio de Genética Animal, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Queensland, Gatton, Queensland, Australia.

<http://www.uu.nl/faculty/veterinarymedicine/EN/Current/agenda/Pages/Koeienenpaardenvoorhetgerecht.aspx>.

Forensic Molecular Biology, Instituto de Medicina, Universidad Médica de Innsbruck, Innsbruck, Austria (http://gerichtsmedizin.at/forensic_molecular_biology.html).

Wildlife Genetics and Microscopy Unit, Australian, Centre for Wildlife Genomics, Australian Museum, Sidney, Australia (<http://australianmuseum.net.au/acwg/#sthash.vjYfEljQ.dpuf>).

Lista de recortes periodísticos

<http://www.seguridadydefensa.com/informes/adn-para-combatir-el-robo-de-ganado-10610.html>

<http://infouniversidades.siu.edu.ar/noticia.php?id=769>,

<http://www.colonbuenosaires.com.ar/semanariocolondoce/cgi-bin/hoy/archivos/00001530.html>,

<http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=9055>

<http://www.ruralprimicias.com.ar/noticia-sra-colaboro-con-la-justicia-para-esclarecer-un-caso-de-abigeato-12018.php>,

<http://www.lanacion.com.ar/1580613-la-sra-y-su-ayuda-contr-el-abigeato>

Cuadro 1.1. *El caso de los asesinatos de la ciudad de Narborough, Reino Unido.*

El primer reporte del uso la técnica de huella genética (ADN fingerprinting) en casos policiales consistió en la exclusión de un hombre de sesenta años acusado de la violación seguida de muerte ocurrida en julio del año 1986 en la ciudad de Narborough, Reino Unido. El sospechoso también había sido acusado de otro caso similar ocurrido en noviembre de 1983 en la misma localidad, y que aún no había sido resuelto. La absolución se basó en que el patrón de bandas de la huella genética obtenido para la muestra de semen recuperada de la víctima y la muestra de sangre perteneciente al sospechoso no coincidían. Sin embargo, las muestras de semen recuperadas en los casos presentaban el mismo perfil genético. Como en base a otras evidencias la policía sospechaba que el violador/asesino era un hombre joven que vivía en el mismo distrito que las víctimas, se procedió a muestrear a toda la población sospechosa de esa localidad (5.500 hombres). El 40% las muestras compartían el mismo grupo sanguíneo que el de las evidencias (muestras de semen), por lo que se procedió a analizarlas mediante la técnica de la huella genética. En principio este análisis no permitió detectar ninguna muestra compatible. Sin embargo, en una conversación fortuita, un cliente admitió al cantinero de un pub que durante el muestreo había donado dos muestras, la suya y la de un compañero de trabajo incapacitado de dar sangre. Posteriormente, el compañero fue identificado y arrestado, y su perfil de ADN coincidió con el de las muestras de semen encontradas en las víctimas. Por lo que finalmente el sospechoso confesó la autoría de ambos crímenes y fue condenado a cadena perpetua.

Cuadro 1.2. *La mascota testifica a favor de su dueño, sospechoso de un crimen.*

En enero de 2005, una joven mujer fue encontrada muerta cerca de una autopista en el sur de Austria. Debido a que el cuerpo había sido quemado, la víctima no podía ser identificada. Sin embargo, se encontró cerca del cuerpo el sweater que vestía la mujer, en el cual se encontraron pelo de origen animal. La morfología de los pelos permitía determinar que podían pertenecer a alguna especie de mustélidos (Mustelidae) o a un perro (Canidae). Simultáneamente, los investigadores policiales identificaron a un joven sospechoso del crimen, en cuyo auto secuestraron pelos de origen animal. De los bulbos pilosos se procedió a extraer y analizar el ADN mitocondrial, con el fin de responder a las dos preguntas planteadas por la Corte: ¿A qué especie pertenecían los pelos? ¿Las muestras del sweater y del auto correspondían al mismo animal? Los resultados obtenidos mostraron que los pelos eran de perro, con la excepción de uno que era de gato. Además, todos los pelos del sweater de la víctima presentaban el mismo haplotipo mitocondrial, mientras que los pelos secuestrados en el auto del sospechoso pertenecían a dos haplotipos diferentes, uno de los cuales coincidía con el haplotipo de la mascota del sospechoso. A su vez, los dos patrones encontrados en el auto no se correspondían a los detectados en el sweater de la víctima.

CAPÍTULO 2

ABIGEATO: DEL LUGAR DEL HECHO AL LABORATORIO

DEFINICIÓN DE ABIGEATO. ETAPAS DE INVESTIGACIÓN. LUGAR DEL HECHO, DELIMITACIÓN Y PRESERVACIÓN. OBSERVACIÓN DEL LUGAR. RECOLECCIÓN DE INDICIOS. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS. TIPO DE MUESTRAS ADECUADAS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO. PRESERVACIÓN DE MUESTRAS. CADENA DE CUSTODIA.

Nora Lía Padola, Analía Margheritis, Ana V. Bustamante

2.1. Consideraciones generales

El abigeato es uno de los delitos rurales que comprende el robo de animales por su carne, ya sea para consumo propio o con el fin de comercializarla. Este delito es clasificado por el Código Penal de la Nación como delito contra la propiedad y como figura especial del hurto. En cuanto a la sanción penal, es más gravoso que el hurto genérico. La tipificación penal responde a la necesidad de mayor protección del ganado, que por su naturaleza debe ser dejado en campo abierto, imposibilitando la custodia efectiva de sus propietarios. El Código Rural de la Provincia de Buenos Aires regula los hechos, actos y bienes de la actividad rural. Según su artículo 2, un establecimiento rural es “todo inmueble que, situado fuera de los tejidos de las ciudades o pueblos de la provincia, se destine a la cría, mejora y engorde del ganado, actividades de granja o cultivo de la tierra, a la avicultura u otras

crianzas, fomento o aprovechamiento semejante” (Código Rural de la Provincia de Buenos Aires y leyes complementarias, 2004).

Existen dos tipos bien definidos de abigeato que se diferencian no sólo por la cantidad de animales sustraídos, sino por la propia modalidad delictiva. El abigeato más común (por la cantidad de hechos denunciados) se denomina de baja escala; en él se sustrae la carne de uno o dos animales y los restos del/los bovinos se abandonan en el campo. El otro tipo de abigeato es el de mediana y gran escala; consiste en el apoderamiento de varios animales que son retirados vivos del campo en camiones tipo jaula o cerealeros, siendo una actividad delictiva mucho más compleja. En cualquiera de los casos de abigeato, la investigación se lleva a cabo según las reglas de la Criminalística. Según la Asociación Criminalista de California (*California Association of Criminalists*; <https://www.cacnews.org/>) esta disciplina es “la profesión y la disciplina científica dirigida al reconocimiento, identificación, individualización y evolución de las evidencias físicas mediante la aplicación de las ciencias auxiliares en el campo de las ciencias legales”. La hipótesis básica de la criminalística es que el criminal siempre deja en el lugar del hecho algo que de algún modo revela la existencia de un delito y de esa manera permite establecer la identidad de su autor. Encontrar ese “algo” es el objetivo de la mencionada ciencia. Es preciso saber qué se quiere estudiar para recién entonces orientar la tarea y, con el método correspondiente, hacer la investigación adecuada. En el resultado final de toda investigación, mucho depende de los primeros pasos que dé el investigador que primero tome contacto con el hecho (Criminalística y lugar del hecho, 2014).

En la investigación del hecho punible se recorren al menos cuatro grandes etapas:

- Búsqueda de indicios en el lugar de los hechos.
- Su recolección y envío al laboratorio.
- Análisis de laboratorios e interpretación de los resultados.
- Elaboración del informe pericial y defensa del mismo en el juicio oral.

2.2. Lugar del hecho

Investigación

De acuerdo a la definición sugerida por el Ministerio de Justicia y Derechos Humanos, a través de la Secretaría de Justicia y Asuntos Penitenciarios, Subsecretaría de Política Criminal de la República Argentina (2004), el lugar del hecho es "...el espacio físico en el que se ha producido un acontecimiento susceptible de una investigación científica criminal con el propósito de establecer su naturaleza y quiénes intervinieron..." , "... puede estar integrado por uno o varios espacios físicos interrelacionados por los actos del acontecimiento investigado..." , "...se caracteriza por la presencia de elementos, rastros y/o indicios que puedan develar las circunstancias o características de lo allí ocurrido." Todo "lugar del hecho" debe ser considerado y tratado como una "escena del crimen potencial" hasta que se constate o se descarte la comisión de un ilícito, debiendo el responsable de su procedimiento preservarlo, "garantizar la intangibilidad de los elementos, rastros o indicios que puedan existir para evitar cualquier pérdida, alteración o contaminación". El lugar del hecho puede ser:

Abierto: es un lugar sin delimitación, al aire libre. Aquí los indicios se ven mayormente afectados por los eventos meteorológicos y los animales carroñeros que pueden dañar de manera irreconocible el cadáver y hasta trasladarlo, imposibilitando determinar el lugar inmediato de lo ocurrido.

Cerrado: este lugar tiene los límites claramente demarcados. Aquí los indicios y el cuerpo de la víctima se hallan con cierto resguardo. Generalmente sólo se ven afectados por la acción del tiempo y, de forma indirecta, por la estación del año.

Otra clasificación hace distinción entre lugar del hecho y lugar de hallazgo:

Típico: cuando los indicios se encuentran en la misma área, por lo que el lugar del hecho será el mismo que el lugar del hallazgo.

Atípico: cuando los indicios se encuentran en lugares diferentes con respecto a la escena.

En los casos de abigeato, generalmente hay dos o más lugares de los hechos:

1) Lugar donde se encuentra el o los animales faenados (en el caso del abigeato de baja escala) o donde se produjo el desapoderamiento de los animales y pueden encontrarse huellas de camiones u otros vehículos utilizados para arriar los animales, o algún efecto dejado por la banda delictiva (para el caso de los abigeatos a mayor escala). Como se mencionó anteriormente, es un lugar abierto afectado por las condiciones atmosféricas, por lo que es conveniente concurrir rápidamente, llevando a cabo una inspección exhaustiva para no perder ninguna evidencia.

2) Lugar de allanamiento, donde se sospecha que fueron llevados los cortes del animal o el vehículo donde son transportados si es una flagrancia, sin dejar de tener en cuenta lugares terciarios o cuaternarios si la carne fue vendida a terceros.

La investigación del lugar del hecho debe ser realizada por un equipo multidisciplinario de peritos convocados de acuerdo a la naturaleza y las circunstancias del hecho que se investiga. El equipo de trabajo pericial debe ser coordinado por un responsable encargado de dirigir las acciones del resto de los peritos (Raffo, 2006).

Para el desarrollo de las actividades en los escenarios de los hechos, se aplican determinados métodos:

- Delimitación y preservación del lugar de los hechos.
- Observación del lugar.
- Graficación / fijación del lugar.
- Recolección de indicios.
- Suministro de indicios al laboratorio.

- Delimitación y preservación

El lugar del hecho debe ser considerado y tratado como una escena del crimen potencial, por lo cual debe ser cuidado hasta la llegada del personal especializado. Asegurar y proteger el lugar del hecho son dos obligaciones relacionadas entre sí. La primera consiste en establecer el cerco perimetral. La segunda, en prevenir cualquier alteración en la condición original del lugar para garantizar la intangibilidad de los elementos, rastros o indicios que puedan existir para evitar cualquier pérdida, alteración o contaminación. Ambas acciones son de vital importancia y de ellas depende el éxito o el fracaso de la investigación.

El principio técnico es no tocar, no pisar ni alterar sin antes documentar a través de la toma fotográfica, filmaciones, croquis y actas. Existen algunas reglas básicas de protección del lugar que deben tenerse en cuenta:

- Delimitar el lugar conservando una adecuada distancia. En los casos complejos, procurar establecer un doble cordón o cerco perimetral para aislar la zona y permitir que sólo los peritos permanezcan en el cerco central, sin que ello implique excluir al resto de los investigadores o autoridades judiciales o policiales, que permanecerán en el segundo vallado.
- No mover ni tocar nada, ni permitir que otro lo haga, hasta que no haya sido examinado y fijado el lugar por quien corresponda.
- Dejar constancia de los cambios que hayan sido inevitables.

- Observación del lugar

Inspección preliminar

Una vez asegurado y protegido el lugar del hecho, se procederá a inspeccionarlo de manera que puedan captarse todos los indicios asociados al hecho que se investiga. El personal designado determinará una técnica de abordaje, de acuerdo a las características del lugar (abierto o cerrado), e implementará técnicas protocolizadas de trabajo

para satisfacer las necesidades de un escenario en particular. Los propósitos específicos más significativos de la inspección son delinear la extensión del área de búsqueda, organizar los métodos y procedimientos que se necesiten y preparar una descripción narrativa de la escena con la existencia y ubicación de detalles sencillamente observables y de posible valor como evidencia, y los elementos que fácilmente puedan sufrir cambios por condiciones climatológicas y de iluminación. Tanto el perito como el fotógrafo y toda persona que tuviere a cargo la investigación del hecho deberán trabajar con guantes a fin de no alterar posibles evidencias o huellas, o dejar las propias en los distintos elementos de la escena. Esta inspección preliminar es el paso más importante para garantizar el éxito de la investigación.

- Acceso

Al lugar deben ingresar solamente los técnicos, profesionales (médicos veterinarios, biólogos, bioquímicos) o personal idóneo en caso de no contar con profesionales (peritos de rastros especializados). El correcto abordaje de la escena del crimen, así como la recolección y conservación de las evidencias, arrojará resultados capaces de esclarecer los hechos criminales que son materia de investigación. El abordaje puede ser:

Lineal: los especialistas en la búsqueda recorren la zona en forma lineal separándose a no más de la distancia de un brazo cada uno de ellos (Figura 2.1). Esta modalidad no es frecuente ya que necesita de mucho personal para poder abarcar una zona de mediano tamaño.

Espiral interior: Menna (2005) propone recorrer en búsqueda de evidencias desde un punto lejano formando un espiral hasta llegar al punto central, en este caso al animal faenado (Figura 2.2).

Otras formas menos utilizadas de abordar el lugar del hecho son en *Strip*, tal como se muestra en la Figura 2.3, o el modo vinculante que, como su nombre lo indica, se basa en una teoría de vinculación entre

víctima – sospechoso – evidencia física (Figura 2.4). Esta última no se utiliza en los casos de abigeato.

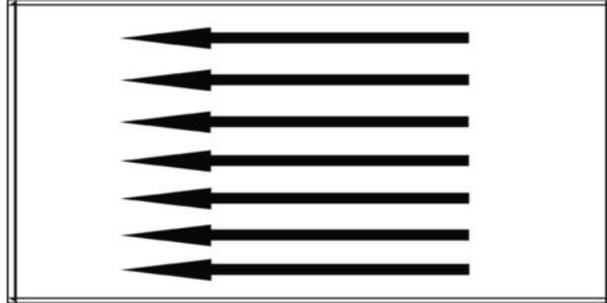


Figura 2.1. Abordaje de la escena del crimen en forma lineal.

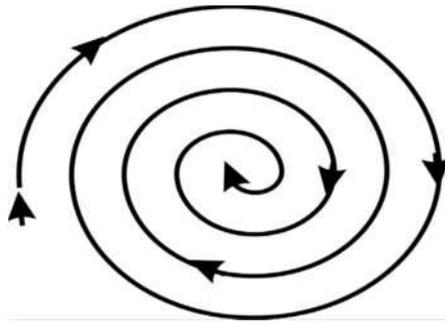


Figura 2.2. Abordaje de la escena del crimen en forma espiral interior.

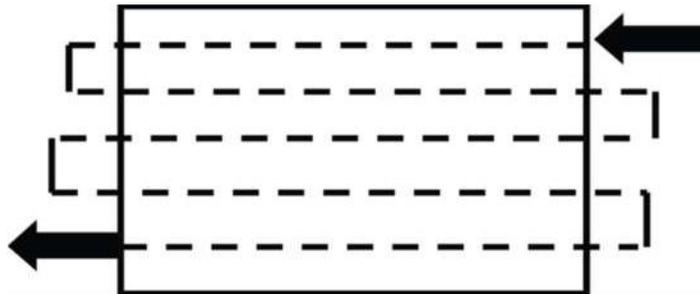


Figura 2.3. Abordaje de la escena del crimen en forma de *Strip* vinculante.

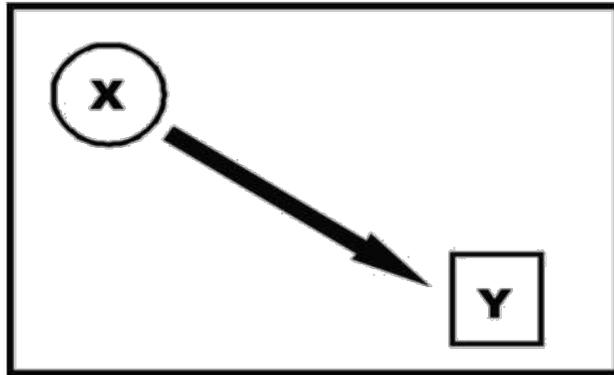


Figura 2. 4. Abordaje de la escena del crimen en forma vinculante.

- Aseguramiento y protección

No debe tocarse, cambiar nada de lugar o alterar ningún elemento hasta que no esté debidamente identificado, medido y fotografiado.

-Graficación / fijación

Descripción narrativa: es la manera de documentar la escena tal como fue encontrada y no debe confundirse con la utilización de bosquejos (croquis), fotografías y anotaciones detalladas, los que sí se llevarán a cabo más tarde. Esta descripción puede prepararse de tres maneras diferentes: manuscrita (notas), con grabaciones de la voz, o bien en video. Cada uno de estos métodos tiene limitaciones que deberían ser evaluadas antes de su utilización.

Fotografiado y relevamiento planimétrico: la fotografía documenta en forma ilustrativa los distintos escenarios del delito dado que se necesita un registro visual completo del hecho para asegurar una cabal investigación y un subsecuente procesamiento. El propósito de la fotografía es dar a conocer una grabación visual del lugar del hecho y todas sus características pertinentes. Es primordial que el escenario esté imperturbado antes de que se tomen las fotografías para que las tomas ilustren las características originales y no contaminadas del lugar, por lo cual es aconsejable realizar varias vistas fotográficas, ya que puede

correrse el riesgo de perder una parte de la escena que parecía no tener significancia y luego adquiere gran importancia. El registro fotográfico debe ir de lo general a lo particular y desde tres puntos principales: a) larga distancia; b) distancia media y c) acercamiento mayor. Es recomendable el uso de iluminación de soporte para una mejor toma fotográfica. Se sugiere el empleo del formato digital *Raw* por ser un archivo de sólo lectura, lo que significa que cualquier modificación genera un archivo nuevo, brindándole una seguridad adicional para los “retoques fotográficos”. Siempre que sea posible, deberán aparecer en las tomas dispositivos de medición como una regla o una cinta métrica, ya que ello permitirá obtener medidas y relaciones de distancia.

2.3. Recolección de indicios

Levantamiento de la evidencia

La evidencia física es todo objeto tangible que conecta al hecho con su autor. Esta evidencia es inanimada, proporciona datos imparciales y resulta ser objetiva; por lo tanto, es la única que no puede cuestionarse, siempre y cuando se haya evitado su manejo inadecuado (*Ver toma de muestra*).

Para la recolección de las evidencias por parte del personal policial encargado de las investigaciones preliminares, del perito veterinario y del fotógrafo, deben tomarse todas las precauciones de manera que no se dañen los objetos que se encuentren en el interior de la escena del crimen y que pueden ser de valiosa utilidad en la averiguación de la verdad de los hechos.

La importancia de realizar una buena recolección y conservación de las evidencias radica en que ello permitirá llegar a descubrir lo que realmente ocurrió e identificar a los presuntos responsables.

Por más que parezca elemental, nunca debe olvidarse que al laboratorio llega lo que se envía y el análisis se lleva a cabo sobre lo que se recibe y no sobre lo que se manda (Moreno, 2006), por lo que si

durante el trayecto o el tiempo transcurrido hasta el análisis el indicio levantado se altera, se analizará esa evidencia alterada.

Registro, señalización y preservación de la evidencia

La tarea pericial es avalada mediante el acta que se labra con motivo del procedimiento, describiendo y detallando todos los indicios levantados, informando sobre el lugar en que fueron hallados a fin de su correcta individualización. Es tarea del Perito que incumbe en la especialidad el depósito de la muestra en un contenedor adecuado según el tipo de indicio (de carácter orgánico o inorgánico), su rotulado, firmas de testigos y planilla de cadena de custodia de cada uno de los indicios. Así se remitirán las muestras a los laboratorios correspondientes y bajo el cumplimiento de las “garantías de la ley” que resguardan el derecho (debido proceso). Es recomendable adjuntar copia del levantamiento de la muestra junto a alguna documentación ilustrativa como fotografías, resumen del hecho o informes preliminares, los cuales aportan datos al personal del laboratorio.

Inspección final y entrega del lugar del hecho

Se realiza con el fin de asegurar que el estado del escenario del hecho haya sido documentado tan completamente como fuera posible. Todos los elementos del lugar deberán ser analizados de acuerdo a un concepto central, dando debida custodia a la cadena del indicio para que éste pueda, a través de métodos científicos, elevarse al rango de evidencia y posteriormente transformarse en prueba jurídica. Concluida la inspección final y habiendo obtenido datos objetivos, se evalúan y se conciben las primeras hipótesis respecto al hecho investigado. De no poder plantearse una hipótesis, no es aconsejable la liberación del lugar del hecho. De tener que volver al lugar, sólo se podrá ingresar previa notificación de las partes y con motivo fundado.

En síntesis, en el lugar del hecho el trabajo ordenado y disciplinado permite el análisis de las características y circunstancias del hecho que se investigue, por lo cual sus diversas etapas deben ajustarse a un ordenamiento de acuerdo a un plan o metodología de trabajo. Hay que recordar que en materia pericial la idea preconcebida y la precipitación o la improvisación son enemigos de la investigación. La primera cuestión cierra la mente del investigador a otras posibilidades y la segunda nos conduce al error, al omitirse pasos y acortarse los tiempos necesarios para la investigación. Por esta razón, se puede afirmar que el éxito de una investigación depende en gran medida de la labor desarrollada en el lugar de los hechos.

2.4. Recolección de muestras

De acuerdo al artículo 266 del Código Procesal Penal de la Provincia de Buenos Aires, el objetivo debe enfocarse en la acreditación de la existencia de un hecho ilícito y en la determinación de la autoría del mismo. Respondiendo a este objetivo es que resulta indispensable elevar todo registro de huella, rastro o indicio al rango de prueba jurídica, así como establecer las motivaciones y los medios que causaron la muerte.

El peritaje en veterinaria es una actividad que está considerada como actividad profesional en la Provincia de Buenos Aires, y respaldada por el inciso 11 del artículo 78 de la ley 9686/81 y su decreto reglamentario N° 1420/83 en su artículo 51 (Schettino, 2007).

Equipo de recolección y manejo de muestras

La recolección de muestras debe hacerse durante la necropsia o con posterioridad a ella por el médico forense, con la colaboración de personal entrenado y con experiencia en la recolección de muestras. La toma de muestras se realizan frente a testigos, preferentemente los abogados de las partes, un escribano o las personas convocadas para

tal fin. En caso de no concurrir persona alguna, personal del laboratorio oficiará de testigo firmando en calidad de tal.

Los miembros del equipo deben extremar las precauciones para evitar o minimizar el riesgo de contaminación, tanto exógena como cruzada, que puede producirse durante el procedimiento. Para ello deben ir equipados con ropa protectora (guantes, mascarilla, batas o ambos) y siempre que sea posible deben utilizar material estéril o bien disponer de los medios necesarios para realizar una limpieza adecuada del material y de las superficies de trabajo, como por ejemplo una solución de lejía comercial al 10% o alcohol.

Equipo básico de un perito forense veterinario

El perito forense debe contar con un equipamiento básico que le permita realizar la necropsia del animal referencia y recolectar muestras para el laboratorio de patología, toxicología, ADN o entomología forense (Figura 2.5.). Es recomendable que estén presentes los siguientes materiales:

- Un cuchillo de hoja de 17 a 20 cm (bien afilado, higienizado y cubierto con papel estéril).
- Un mango de bisturí.
- Diez hojas de bisturí nuevas, para recambio.
- Una pinza anatómica con diente de ratón.
- Una pinza de punta fina tipo odontológico.
- Un pincel fino, tipo N° 1.
- Una tijera curva.
- Una tijera recta.
- Doce pares de guantes descartables.
- Un par de guantes de goma.
- Barbijos de tela.
- Ropa de trabajo limpia y desinfectada.
- Botas de goma limpias.
- Una lupa de mano.

- Un rollo de papel de cocina.
- Un paquete chico de algodón estéril.
- Dos litros de alcohol fino 70° (siete partes de alcohol en tres partes de agua destilada).
- Diez frascos Bisteril con tapa a rosca.
- Diez tubos plásticos con tapa a rosca.
- Veinte tubos plásticos esterilizados (en lo posible, tapa rosca).
- Una cámara fotográfica.
- Planillas de protocolo de toma de muestra.
- Acta de constitución en el lugar, firmada por testigos.
- Termómetro químico.
- Una linterna de tres elementos (mínimo).
- Una heladera de telgopor o portátil.



Figura 2.5. Parte del equipo básico de un perito forense veterinario.

La necropsia del cadáver o sus restos

El procedimiento de necropsia sigue los lineamientos establecidos cuando el cadáver se encuentra completo, revisando externamente para establecer posibles heridas, fracturas o soluciones de continuidad en piel o cuero. Se debe revisar la cabeza, para advertir posibles pérdidas de sangre que orienten la causa de muerte para luego proceder a la apertura y cuereado del animal. Se deben tener en cuenta distintas posibles situaciones:

- De constatarse ingreso de balas, se intentará seguir el recorrido interno hasta obtener el proyectil.

-En las situaciones de animales con mordedura de perros u otro animal predador, se intentará medir el ancho de los colmillos que impactan sobre cuero y musculatura.

- Si se sospecha la utilización de un arma blanca, se debe tratar de determinar el perfil, observar si son ovaladas y la sección de la hoja (forma y labio de la herida).

-En el caso de intoxicaciones o envenenamientos se dispondrá de la toma de muestras consignadas para la sospecha de cada tóxico. En general se recomienda obtener trozos de intestino, estómagos, riñones y pulmones, como también muestras de sangre.

- Si no se tiene información de la data de muerte, y dado el estado de putrefacción del cadáver o de los restos, se recomienda observar la presencia de insectos como moscas (verdes o grises), larvas o coleópteros (cascarudos) sobre el cadáver e intentar su captura, ya que pueden indicar con aproximación la etapa y data de muerte (Schettino, 2007).

Identificación por pruebas de ADN

Los métodos de identificación individual deben ser difíciles de manipular en forma fraudulenta. En el ámbito de los animales domésticos, la identificación surge como una necesidad del sistema de cría o de producción, y brinda herramientas válidas para la certificación de origen. Los sistemas de identificación pueden estar relacionados con el pelaje, por señales en las orejas, tatuajes, identificación por marca o números en el cuero, identificación por silueta o fotografía, o por corte de la cola. Todos estos modos de identificación hacen referencia a características externas del animal, las cuales pueden sufrir alteraciones a lo largo de la vida o bien desaparecer con él. Sin embargo, las pruebas de ADN para identificación y filiación permiten distinguir de manera inequívoca a un individuo a lo largo de toda su vida.

La tipificación del ADN constituye la prueba más contundente para la identificación. La técnica usada es la misma que se usa en las pruebas forenses de humanos, por lo que su eficiencia y confiabilidad se halla próxima al 100% de seguridad. No hay posibilidad alguna de que dos bovinos tengan el mismo perfil genético, con excepción de los gemelos univitelinos. Tampoco existe la posibilidad de que el ADN pueda variar con el tiempo o ser adulterado (Beledo, 2007).

Tipo de muestras adecuadas para el análisis genético

- Muestras de tejido

Se pueden tomar muestras de tejido muscular, hígado, cuero (sólo en caso de no haber otros tejidos disponibles), hueso, o vísceras. Las dimensiones de las muestras no deben exceder los 2 cm² y deben colocarse en recipientes limpios que contengan alcohol etílico diluido al 70% (3 partes de agua y 7 partes de alcohol). La muestra debe estar completamente sumergida en alcohol y no debe someterse a altas temperaturas. Es preciso tener en cuenta que las muestras para análisis genético nunca deben ser recogidas ni almacenadas en líquido fijador (por ejemplo, formaldehído) (Chieri y Zannoni, 2001). Las muestras de hueso o dientes deben conservarse en sobres de papel debidamente rotulados a temperatura ambiente en lugares secos.

- Muestras de sangre (animal vivo)

Se recogerán de 5 a 10 ml de sangre en un tubo correctamente rotulado y con anticoagulante tipo EDTA. Una vez introducida la sangre en el tubo con anticoagulante, mezclar por inversión varias veces para evitar la formación de coágulos. Dicho tubo deberá introducirse en una bolsa o tubo de transporte correctamente precintado, que se mantendrá refrigerado hasta su llegada al laboratorio. Si se requiere sangre para la realización de otro tipo de análisis, por ejemplo toxicológico, deberán recogerse muestras adicionales (Rivas San Martín et al., 2007).

-Manchas de sangre

Un requisito imprescindible para tener éxito en la recolección de las manchas de sangre es su *correcto secado* (preferentemente al aire). Las manchas húmedas pueden recolectarse utilizando hisopos de algodón, siempre que no sea factible enviarlas sobre el sustrato en el cual se encuentran (ropas, vidrios, tierra, hojas, pasto), para luego colocarlas correctamente secas en sobres individuales de papel. Pueden encontrarse sobre superficies poco absorbentes y en este caso se diluyen en hisopos de algodón estériles humedecidos con agua estéril o con solución salina al 0,9%. Se debe frotar el hisopo en el área donde se encuentran las manchas utilizando *un hisopo diferente para cada mancha, que se guardarán en sobres individuales correctamente rotulados*.

Los hisopos se pueden dejar secar al aire para prevenir la degradación o pueden colocarse en un freezer. Si las muestras se refrigeran, deberá utilizarse un equipo refrigerante para el envío de las mismas, ya que la interrupción de la cadena de frío rápidamente contamina y degrada la evidencia biológica, impidiendo o dificultando enormemente la realización de los análisis de ADN (Chieri y Zannoni, 2001).

-Pelos y cabellos

Se debe recolectar 20 ó 30 pelos del animal a estudiar, arrancados y no cortados, preferentemente de la punta de la cola. Deben tener el bulbo piloso, ya que se trabaja con el ADN que se encuentra en sus células (Figura 2.6.). Es recomendable atar con una cinta el conjunto de pelos antes de ser arrancados, para evitar que se dispersen y facilitar el trabajo del laboratorio. Los pelos deben colocarse en un sobre de papel tipo carta el cual deberá ser cerrado con cinta adhesiva sin mojar con saliva el borde engomado del sobre (podría existir contaminación con ADN). El éxito del análisis depende de la cantidad de pelos con bulbo que contenga la muestra (Chieri y Zannoni, 2001).



Figura 2.6. Obtención de muestras de pelo.

Otros tipos de muestras biológicas

Es factible obtener ADN para realizar una identificación a partir de heces, orina, secreciones nasales y uñas. Particularmente en la orina, el éxito del estudio dependerá de varios factores, entre ellos la demora entre la toma de la muestra y el comienzo del análisis. En orina fresca, el éxito es superior que si se trata de orina congelada.

2.5. Preservación de las muestras

Las muestras recolectadas deben ser correctamente envasadas para garantizar una adecuada preservación hasta su llegada al laboratorio. Para ello, es conveniente seguir las siguientes recomendaciones generales:

- Colocar las muestras en recipientes individuales con cierre irreversible o doble envase, especialmente cuando se trate de fluidos biológicos.
- Precintar los recipientes utilizados.
- Mantener siempre por separado las muestras dubitadas y las muestras de referencia.
- Todos los recipientes utilizados para el envasado de muestras deben estar correctamente etiquetados y con la cadena de custodia cumplimentada.

Preservación incorrecta

A continuación se detallan casos de preservación incorrecta: -Tubos sin rótulos (Figura 2.7.).



Figura 2.7. Muestras recolectadas en tubos sin rótulo.

-Envases NO cerrados herméticamente: el alcohol derramado ha borrado los rótulos (Figura 2.8.).



Figura 2.8. Muestras con rótulos alterados por incorrecto cierre de los envases.

- Muestras que no se han secado correctamente: la sangre fresca del hisopo ha traspasado al papel (muestra contaminada) (Figura 2.9.).



Figura 2.9. Muestras contaminadas por incorrecto secado de las mismas.

- Tubos colocados en sobres que se aplastan con el transporte (Figura 2.10.).



Figura 2.10. Muestras dañadas durante el transporte.

2.6. Suministro de indicios al laboratorio

Aunque parezca elemental, no debe olvidarse que al laboratorio llega lo que se envía y el análisis se lleva a cabo sobre lo que se recibe (Moreno, 2006). Si durante el trayecto o el tiempo transcurrido hasta el análisis el indicio levantado se altera, será sobre esa evidencia alterada sobre la que se trabajará. Si algún indicio no se levanta, o se lo hace mal, el resultado final será como si no hubiese existido, afectando por completo el proceso judicial. Por esta razón se puede afirmar que el éxito de una investigación depende en gran medida de la labor desarrollada en el lugar de los hechos.

Los indicios que se remitirán al laboratorio serán las evidencias (muestras dubitadas) y las referencias (muestras indubitadas). En el caso del abigeato, el laboratorio deberá identificar y confirmar si las muestras dubitadas (por ejemplo, trozos de carne hallados en poder del sospechoso o animales en pie en litigio) se corresponden, es decir, si son idénticas a las muestras indubitadas (por ejemplo, carcasa de animal faenado en el establecimiento de la víctima o bien en el caso de hacienda en pie, cuando el propietario puede certificar la filiación de los animales que le fueron sustraídos).

Planilla de cadena de custodia

Tanto en los formularios de recolección de muestras (dubitadas y de referencia) como en los recipientes utilizados para el envasado de dichas muestras debe existir un espacio dedicado a la cadena de custodia, que siempre debe ser correctamente cumplimentado (Rivas San Martín et al., 2007). Los datos específicos que deben constar en los formularios son:

- El código asignado a la muestra.
- El número de precinto del envase.
- La fecha y hora de la toma.
- El nombre o identificación de la persona que realiza la toma.
- El nombre o identificación de la persona que chequea la toma.

En los envases primarios y/o secundarios, los datos específicos que deben constar son:

- La fecha de la toma.
- El nombre o identificación y la firma de la persona que realiza la toma.

Recepción de muestras en instituciones

Cuando las muestras judiciales son entregadas en mesa de entrada de instituciones como Facultades o Institutos de Investigación, es conveniente tener una planilla de cadena de custodia para la recepción y envío de las muestras al laboratorio encargado de los análisis de ADN correspondiente (Figura 2.11).

Recepción de muestras judiciales.

Instructivo para mesa de entradas de la UNCPBA.

Ante la recepción de muestras judiciales, dar aviso inmediato al Laboratorio de ADN de la Facultad de Ciencias Veterinaria (43-9850 int. 237/256).

Horario de atención: 8.30 hs a 17.00 hs.

Responsables: Dras. Nora Lía Padola y Ana V. Bustamante

Por favor, registrar en la planilla de cadena de custodia que se adjunta, la siguiente información:

	Recibe de:	Entrega a:
Fecha		
Tipo y n° de documento		
Firma		
Aclaración		

	Recibe de:	Entrega a:
Fecha		
Tipo y n° de documento		
Firma		
Aclaración		

Figura 2.11. Ejemplo de planilla de cadena de custodia para la recepción y envío de las muestras al laboratorio.

2.7. Referencias Bibliográficas

- Beledo, G.A., (2007) *Abigeato y delitos rurales*. Ministerio de Seguridad de la Provincia de Buenos Aires. <http://www.mseg.gba.gov.ar/ForyCap/Contenidos/ABIGEATOYDRURAL ES.pdf>
- Chieri, P. y Zannoni, E., (2001) *Prueba del ADN*. 2º edición. Ciudad de Buenos Aires. Editorial Astrea.
- Código Rural de la Provincia de Buenos Aires y leyes complementarias, (2004). 10º edición. Buenos Aires. Editora Lex. 350 pp.
- Guzmán, C.A., (2000). *Manual de Criminalística*. Buenos Aires. Editorial La Rocca.
- Menna, A.R., (2005). *Peritaje en el lugar del hecho*. Carrera de Tecnicatura Superior en Seguridad Pública. Tandil, UNCPBA, 22 pp.

Ministerio Público, Procuración General, Suprema Corte de Justicia de la Provincia de Buenos Aires. Criminalística y Lugar del hecho. [http://www.mpba.gov.ar/web/contenido/Lugar del hecho.pdf](http://www.mpba.gov.ar/web/contenido/Lugar%20del%20hecho.pdf)

Moreno González, L.R., (2006) *Notas de Criminalística*. 3º edición. México. Editorial Porrúa.

Raffo, O., (2006) *La muerte violenta*. Ciudad de Buenos Aires. Editorial Universidad

Rivas San Martín, E., Prieto Ruiz-Canela, M.V., Aler Gay, M. et al., (2007) *Recomendaciones para la recogida y remisión de muestras con fines de identificación genética en grandes catástrofes*. Grupo español portugués de la ISFG.

Schettino, D.M., (2007) *Metodología del trabajo del Perito Forense veterinario*. REDVET. Número 4 (4), pp. 8.

CAPÍTULO 3

MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN

MARCO HISTÓRICO DEL USO DE MARCADORES.
INFORMACIÓN GENÉTICA: CLASIFICACIÓN Y UTILIDADES.
FLUJO DE MUESTRAS. TÉCNICAS DE USO FRECUENTE
EN FORENSE. TÉCNICAS DE NUEVA GENERACIÓN.

Egle E. Villegas Castagnasso, Elina Francisco, Julián A. Crespi, Silvina Diaz, Claudia M. Corbi Botto, María V. Ripoli

3.1. Concepto y marco histórico

En el primer capítulo se definió la genética forense como la especialidad que comprende la aplicación de técnicas de biología molecular para la identificación de individuos/razas/especies con el fin de auxiliar en la resolución de casos judiciales. Para este fin es necesario determinar el genotipo de los individuos o de los restos biológicos que forman parte de la investigación, definiendo como genotipo al conjunto de información genética que posee un organismo. Dentro del genotipo, se analizan determinadas regiones que resultan informativas en la distinción de individuos/razas/especies, ya que las mismas presentan cambios en la secuencia de bases del material genético que generan variabilidad. Estas regiones se denominan polimórficas y cuentan con dos o más variantes en una población/especie, considerando que la variante menos frecuente no puede ser mantenida únicamente por mutación (Ford, 1965).

Inicialmente, las diferencias entre individuos se expresaban mediante la descripción de detalles en su aspecto externo (fenotipo), como por ejemplo el color de capa, la presencia de manchas, remolinos, marcas, tatuajes o alguna otra particularidad destacable. Debido a que las descripciones realizadas eran subjetivas, por depender de cada observador, se incurría en errores que hacían de éste un método escasamente informativo en la resolución de disputas por origen o progenie.

El comienzo del análisis de las regiones polimórficas se produce a principios del siglo XX, cuando el médico austriaco Karl Landsteiner describió diferencias en el sistema sanguíneo ABO (Landsteiner, 1900). Posteriormente, Von Dürgen y Hirszfeld determinaron que este sistema presentaba herencia mendeliana simple, lo que significa que la existencia de cada variante (alelo) en el individuo puede justificarse por la presencia en uno de los progenitores. Esto es así para todos los organismos que tengan reproducción sexual, donde cada progenitor aporta la mitad del material genético para la formación del nuevo individuo. Por ser un sistema inalterable a lo largo de la vida, permite distinguir entre individuos de forma objetiva, analizar vínculos biológicos y excluir a los individuos que no están relacionados. Además, el grupo de trabajo de Landsteiner también describió otros antígenos eritrocitarios y leucocitarios que presentaban polimorfismo y herencia mendeliana como el Rh, MNSs o Duffy. Con estos aportes, hacia mediados del siglo XX los investigadores contaban con un número importante de sistemas informativos (marcadores genéticos) que permitían un análisis objetivo para la resolución de disputas judiciales, pudiendo excluir a los individuos que contaran con una combinación alélica diferente al progenitor putativo o al vestigio biológico hallado.

Las pruebas realizadas basándose en la descripción del aspecto exterior permitían análisis poco confiables. Con la aparición de los marcadores a nivel serológico, las conclusiones aumentaron el poder de discriminación en un 40%, y con la utilización de los polimorfismos del

MHC el poder discriminatorio se elevó al 80%. Así, el desarrollo creciente de diversas técnicas para la identificación del polimorfismo en distintos sistemas hizo que se ampliara el tipo de caracteres analizados, no limitándose sólo a descripciones fenotípicas y grupos sanguíneos sino que también se sumaban los polimorfismos a nivel proteico o bioquímico. De este modo, la certeza con la que se podían dar los resultados de un análisis fue incrementándose, tanto por el aumento del número de sistemas analizados como por el tipo de marcadores utilizados, mejorando considerablemente el poder de discriminación.

En el año 1953, la descripción de la estructura del ADN por James Watson y Francis Crick conformó un avance decisivo para el nacimiento de la biología molecular, siendo la base del desarrollo científico que continúa hasta nuestros días. Este descubrimiento, sumado al desarrollo de nuevas técnicas, permitió identificar regiones del ADN que presentan diferencias entre individuos, pudiendo de este modo distinguirlos de forma fehaciente. Ejemplo de ello son los antígenos del MHC. A partir de 1970, el desarrollo del conocimiento en este campo revolucionó las pruebas biológicas de la paternidad (Mayr, 1970). Sin embargo, estos marcadores genéticos presentaban grandes limitaciones a la hora de analizar muestras degradadas, que se encuentran en escasa cantidad o que no son frescas, como sucede frecuentemente en el ámbito forense. De este modo, poco o nada podía decirse del individuo al que pertenecía un vestigio biológico, principalmente manchas hemáticas, cabello o esperma. Por este motivo, en ese entonces la ayuda brindada a la justicia era realmente limitada.

En el año 1978, los microbiólogos Werner Arber, Daniel Nathans y Hamilton Smith describieron el funcionamiento de las enzimas de restricción, utilizadas por las bacterias como mecanismo de defensa contra virus invasores, que cortan el ADN cuando reconocen una secuencia específica, favoreciendo su degradación. Esta propiedad brindó una nueva herramienta para poder detectar diferencias entre individuos.

A principio de la década siguiente, Alex Jeffreys (1982) describe patrones electroforéticos de bandas de ADN altamente variables y heredables, que permiten la identificación genética de un individuo. El patrón de bandas característico obtenido para cada individuo se conoce como huella genética. Esta técnica fue utilizada por primera vez para resolver un caso judicial en 1985, demostrándose los antecedentes británicos de un niño cuya familia materna era originaria de Ghana. En otro caso forense, la aplicación de esta técnica permitió condenar a un violador y asesino de dos adolescentes en Inglaterra, analizando muestras de semen tomadas de las víctimas. Esta fue la primera condena en el mundo avalada por pruebas de ADN en el campo forense (*para más detalles, ver Cuadro 1.1*). Recién en 1987 los reactivos necesarios para estas pruebas pudieron comercializarse. Desde entonces, el análisis genético ha servido para la administración de justicia. Al tratarse de pruebas vinculantes, ofrecen el medio necesario para que con certeza y rigor científico se determine el perfil genético de un individuo, necesario para auxiliar en un caso judicial. Estos marcadores, que permitían analizar la variabilidad a nivel de ADN, formaron parte del comienzo de las pruebas que se denominan de inclusión, puesto que su poder de discriminación, acompañado por el análisis estadístico necesario, permite determinar si se trata de la combinación alélica que uno espera y que esto no se debe al azar.

En el año 1984, el bioquímico estadounidense Karl Mullis describe la PCR. La técnica amplifica una región específica de ADN, seleccionada a través de cebadores, para obtener un elevado número de copias con gran rapidez y fiabilidad. Este hecho permite que se puedan realizar análisis partiendo de cantidades muy pequeñas de ADN (del orden de los nanogramos), lo que antes no hubiera sido posible. Como esta situación es frecuente en el área forense, la PCR se ha convertido en una invaluable herramienta. Sumado a esto, sus numerosas variantes han permitido poner de manifiesto diferencias tanto a nivel individual como entre razas o especies.

El conocimiento de los genomas comienza en el año 1990 con el desarrollo del proyecto genoma humano, que tenía como finalidad determinar las secuencias de bases nitrogenadas que componen el ADN. Posteriormente, se identificaron y ubicaron en el genoma humano secuencias de interés, principalmente en el área médica. En el caso específico de los genomas de animales domésticos, los primeros en ser descritos fueron los de gallina y perro, seguidos en tercer lugar por el genoma bovino. Hasta la actualidad se ha completado la secuencia de más de 180 genomas (<http://www.genomenetwork.org>). Del mismo modo que en los animales, se ha desarrollado el estudio de genomas vegetales, donde *Arabidopsis* fue el primero en ser completado. Al igual que en el área animal, en los vegetales el desarrollo de los genomas ha estado a cargo de consorcios internacionales con numerosos países implicados. El conocimiento de los diferentes genomas ha permitido la detección de nuevas secuencias polimórficas que se utilizan en la genética forense. En la Figura 1.1 se grafica en una línea temporal los avances tecnológicos descritos anteriormente.

Desde la llegada de las pruebas de ADN, se cuenta con análisis mucho más poderosos en cuanto al poder de discriminación. El análisis simultáneo de numerosas regiones variables del material genético permite obtener conclusiones de hasta un 99,99% de exactitud (ver *Capítulo 5*).

El mejoramiento en los métodos de extracción del ADN, sumado al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular acompañadas del análisis estadístico requerido, ha optimizado los tiempos y las pruebas científicas para ayudar en la resolución de problemáticas judiciales. A continuación se tratará la disposición del material hereditario a nivel celular y las técnicas que permiten poner de manifiesto las regiones que son informativas en el área forense.

3.2. Información genética: localización y utilidades

La información genética de un organismo eucariota cuenta con miles de millones de pares de bases que componen el ADN nuclear, mientras que una porción menor se halla en las organelas citoplasmáticas como las mitocondrias y los cloroplastos (Figura 3.1). El material genético nuclear se hereda en partes iguales tanto vía materna como vía paterna, según patrones mendelianos. En el caso del ADN citoplasmático, la herencia del material genético es únicamente materna, ya que el óvulo es el que aporta las organelas citoplasmáticas del futuro cigoto.

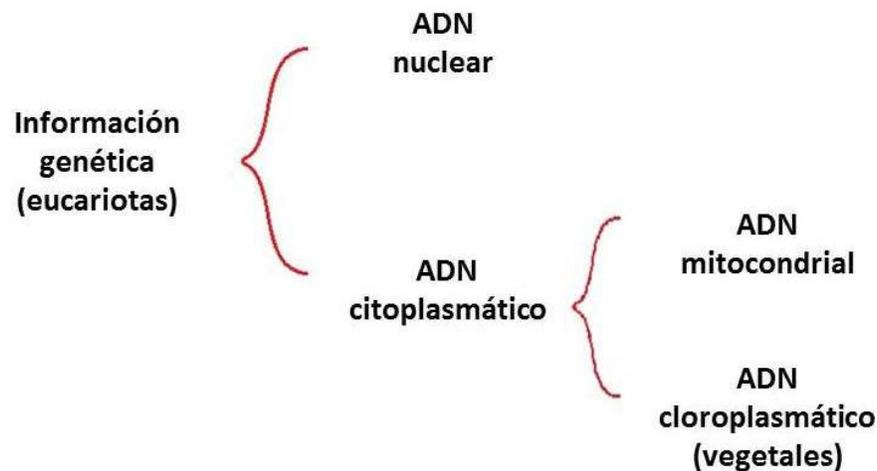


Figura 3.1: Genomas presentes en un organismo eucariota.

3.2.1. ADN nuclear

El ADN nuclear está organizado en secuencias que codifican para productos secundarios (ARN, péptidos y proteínas) que tendrán una función determinada, denominadas *ADN expresivo o codificante*. El resto del ADN lo conforman secuencias que no serán transcritas a proteínas y que se conocen como *ADN no codificante* (Figura 3.2).

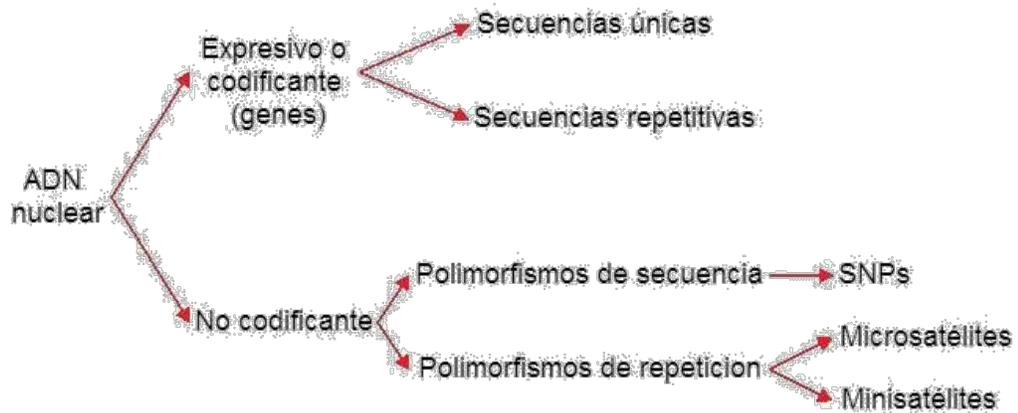


Figura 3.2: Clase de secuencias de ADN presentes en el ADN nuclear de un organismo eucariota.

Del total del ADN nuclear, sólo del 2 al 10% está constituido por secuencias codificantes, siendo éstas genes que constituyen la unidad fundamental y funcional de la herencia. Estos genes codifican para la síntesis de ARNs y proteínas, que son los componentes básicos de las células. En general, estas secuencias son poco variables, presentándose alguna excepción como en el caso de los genes del MHC.

El ADN no codificante, al no estar sujeto a una presión selectiva intensa, admite mayores niveles de variación en comparación con las regiones de ADN codificante. De esta manera, se encuentran regiones altamente variables cuyo análisis evidencia diferencias entre individuos, por lo cual son extensamente empleadas para el análisis forense. Dentro de las secuencias no codificantes, la presencia de las distintas variables puede estar determinada por la composición (secuencia de bases) o la longitud del fragmento de ADN analizado (número de repeticiones).

Los polimorfismos en la secuencia (cambio de uno o más nucleótidos) se producen por mutaciones en las bases nitrogenadas que componen la secuencia de ADN analizada. En el caso de presentarse en un solo sitio, se habla de mutación puntual y el polimorfismo se conoce como

polimorfismo de nucleótido simple (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*). En este grupo también hallamos aquellos sistemas cuyos alelos se distinguen por el corte diferencial con enzimas de restricción, donde el cambio de secuencia afecta al sitio de corte de la enzima, permitiendo que una variante alélica se corte y la otra no.

Por otro lado, los polimorfismos de longitud son aquellos cuyas variantes pueden distinguirse por el cambio en el largo de la secuencia a analizar. Recordemos que estamos hablando siempre de la misma región analizada, ya sea determinada por cebadores específicos en el momento de la PCR o por sondas al momento de la hibridación. Este es el caso de las secuencias microsatélites y minisatélites, donde cada alelo está definido por el número de repeticiones en tándem de la secuencia núcleo (*core*). Así por ejemplo, un alelo estará determinado por tres y otro por cuatro repeticiones. En el caso de los microsatélites, estas secuencias están formadas por dos a seis nucleótidos, mientras que en los minisatélites tienen alrededor de treinta pares de bases. Estas repeticiones se presentan en diferentes lugares (*loci*) del genoma y cada una constituye un marcador genético diferente (Hamata et al., 1982).

En el caso específico de los microsatélites, son los marcadores de elección en el ámbito de la genética forense, por su distribución uniforme a lo largo del genoma, el alto número de alelos que presentan cada sistema, su naturaleza codominante (ambos alelos son observables) y su fácil detección (Chehab et al., 1991; Oudet et al., 1991).

Un caso especial dentro del ADN nuclear es el ADN del cromosoma Y. En los mamíferos sólo lo portan los machos y se transmite de los padres a la descendencia masculina, lo cual permite analizar linajes paternos. Cabe destacar que las regiones analizadas en estos casos se encuentran en la región pseudoautosómica del cromosoma Y, esto es, la región de este cromosoma sin homología con el cromosoma X.

3.2.2. ADN mitocondrial (ADNmt)

El ADNmt presenta herencia materna, es decir que sólo es transmitido por la madre, mientras que el ADN mitocondrial del padre no pasa a la descendencia. Los individuos que provienen del mismo linaje materno poseen el mismo ADNmt. Éste es circular, cerrado y de doble cadena, lo que le confiere mayor estabilidad con respecto al ADN nuclear, frente a fenómenos degradativos como los que se presentan comúnmente en los casos forenses. Sumado a ello, cada célula presenta un alto número de copias de ADNmt (10 a 100 mitocondrias por célula), lo que permite que sea utilizado cuando se presenta una muestra con escaso material periciable.

El análisis del ADNmt se realiza mediante la amplificación de regiones de interés seleccionadas de acuerdo al tipo de análisis requerido, las que luego son secuenciadas permitiendo el análisis comparativo. Este análisis es especialmente útil en el ámbito forense para estudios de identificación, filiación por linajes maternos e identificación de especie de origen (*ver Capítulo 6*).

3.3. Flujo de muestras en forense/procedencias

Debido a que el ADN se encuentra en cualquier resto biológico que contenga células nucleadas, la recolección de muestras forenses tiene múltiples orígenes, como por ejemplo tejido, semen, cabellos, manchas hemáticas, saliva, heces, entre otras. A menudo se trata con vestigios biológicos que están lejos de ser la muestra ideal, tanto en lo que se refiere a su cantidad como a su calidad. Con respecto a la calidad hacemos referencia a muestras degradadas o sometidas a condiciones ambientales adversas y en las que el ADN se encuentra muy fragmentado. También hay que tener en cuenta la presencia de determinadas sustancias que deben ser eliminadas en esta etapa para evitar inhibiciones en la reacción de amplificación como tintes textiles,

altas concentraciones de melanina o hemoglobina. Así, el estudio forense comienza con la toma de la muestra (*ver Capítulo 2*), la cual debe cumplir con ciertos requisitos en los métodos de recolección y debe resguardarse de manera que se conserve la mayor cantidad de células para el análisis.

El segundo eslabón en el estudio forense es la extracción de ADN. Para ello, hay un método específico acorde al origen de la muestra y a su estado de degradación, existiendo numerosas opciones. Algunas de ellas tienen insumos de fácil preparación en el propio laboratorio y otras son kits comerciales que incluyen todos los reactivos necesarios.

Una vez obtenido el material genético, se cuantifica por electroforesis comparativa y/o espectrofotometría, y más recientemente PCR en tiempo real, para saber cuál es la concentración y la calidad de partida. En el caso de la electroforesis comparativa, se realiza la corrida incluyendo una muestra testigo de concentración conocida y que por comparación permite estimar la concentración y el grado de degradación de la muestra problema. La otra alternativa es la utilización del espectrofotómetro, que proporciona con mayor exactitud la concentración y permite estimar la proporción de ciertos contaminantes, como por ejemplo proteínas.

El siguiente paso es la amplificación de la muestra problema. Para llevar a cabo este paso se debe determinar cuál o cuáles son los marcadores adecuados para resolver la problemática planteada y aplicar la técnica necesaria. Posteriormente, se determinarán los alelos en cada sistema elegido, lo que permitirá establecer el perfil genético para realizar el análisis específico. Es importante señalar que la automatización de la mayoría de las técnicas utilizadas en este ámbito permite un mejor sistema de trabajo en los laboratorios, ya que ha permitido aumentar la cantidad de muestras a procesar y ha reducido considerablemente el tiempo de obtención de los perfiles genéticos. Una vez obtenidos, se realizan los análisis necesarios con la evaluación estadística apropiada, lo que dará el marco de certeza de las

conclusiones obtenidas. En la Figura 3.3 se ejemplifica el flujo que siguen las muestras al ingresar al circuito forense para el caso de la tipificación por microsatélites.

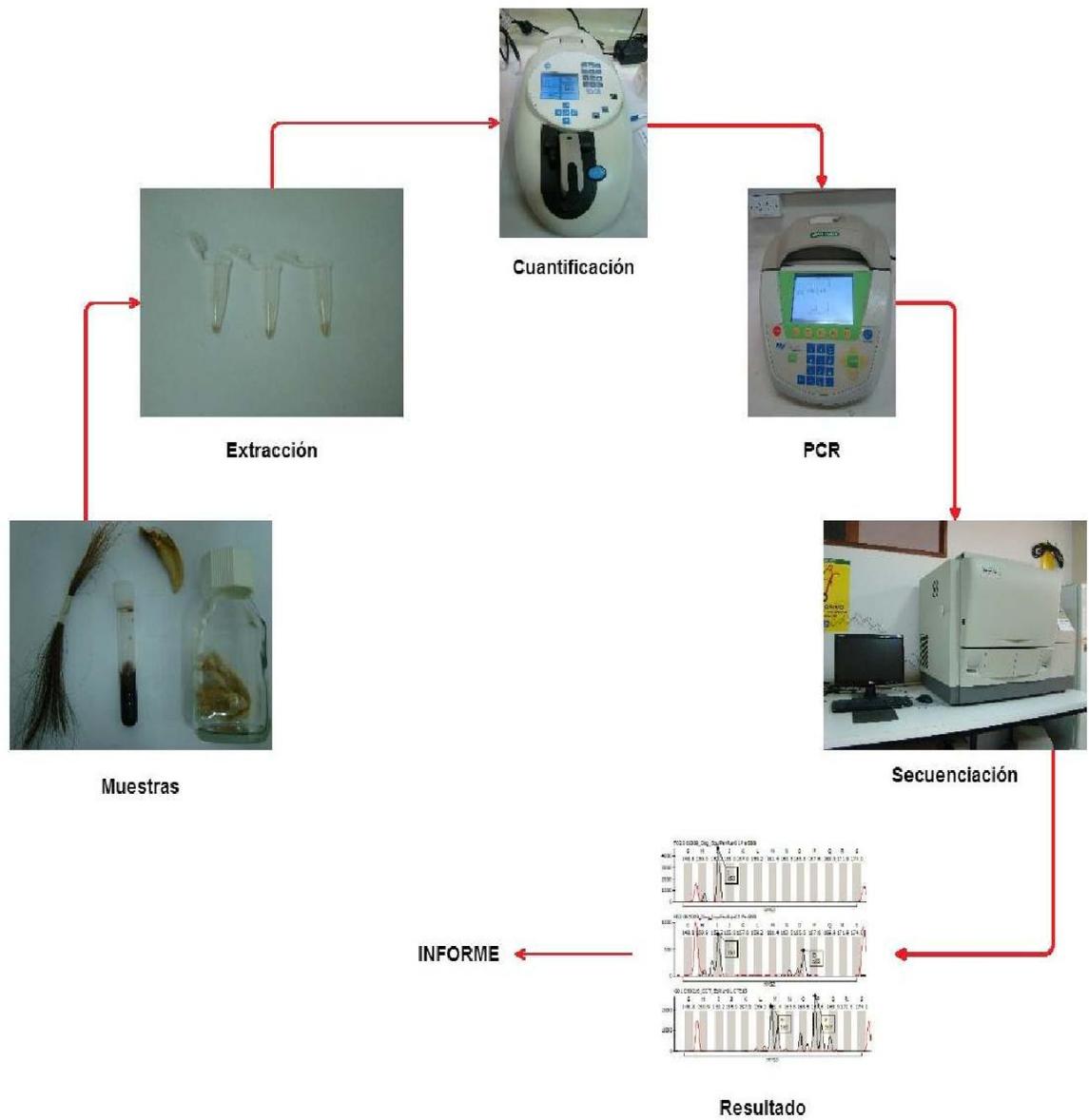


Figura 3.3: Flujo de trabajo para el análisis de una muestra de ADN mediante marcadores de tipo microsatélites.

Por otra parte, las técnicas y metodologías empleadas deben cumplir con normas que aseguren que los distintos procesos, desde la extracción hasta la obtención del perfil genético, se realizan bajo normas estrictas de calidad (*ver Capítulo 10*).

Con respecto a lo edilicio, es necesario delimitar los espacios de trabajo y establecer un flujo unidireccional desde la extracción hasta la obtención de datos, ya que el sentido inverso entre alguna de estas etapas, sobre todo de la extracción a la amplificación, favorecería la posibilidad de contaminación.

3.4. Técnicas de uso frecuente en forense

Como se mencionó anteriormente, en el año 1984 se desarrolló el método de la PCR. Esta técnica representó una revolución tanto en el área de la biología como de la medicina, y dentro de la Genética Forense permitió la resolución de un gran número de casos que no hubieran podido resolverse debido a la cantidad limitante de ADN o a su estado de degradación.

Los polimorfismos del ADN pueden ser de diversos tipos, desde una mutación de una sola base hasta el cambio en el número de unidades repetidas en tándem. La gran versatilidad de la técnica de PCR permitió el desarrollo de diferentes variantes de esta metodología, que se adaptan al tipo de polimorfismo analizado y permiten resolver distintas situaciones. A continuación describiremos en forma breve las principales metodologías utilizadas en genética forense:

3.4.1. PCR-RFLP. PCR de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés restriction fragment length polymorphism)

Este método se basa en la detección de diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de una secuencia de

ADN determinada. Dicha secuencia o fragmento de ADN debe ser previamente amplificado mediante PCR y sometido luego a la acción de una o varias enzimas de restricción (Damiani *et al.*, 1990; Denicourt *et al.*, 1990; Pinder *et al.*, 1991). Las enzimas de restricción o endonucleasas son proteínas bacterianas que digieren al ADN de doble cadena. Estas enzimas realizan el corte o digestión cuando reconocen en la secuencia del ADN un determinado motivo nucleotídico o diana de restricción (Meselson y Yuan, 1968). Estas secuencias específicas se caracterizan por ser palindrómicas (inversamente repetidas) y tener una longitud de 4 a 10 pares de bases.

La técnica PCR-RFLP consiste en amplificar una región determinada del ADN y luego someterla a la acción de endonucleasas específicas. Las diversas mutaciones que presentan las diferentes moléculas de ADN son las responsables de la aparición o desaparición de los sitios de restricción, y este hecho es a su vez el responsable de generar los diferentes patrones de restricción. Una vez que se realiza la digestión se comparan los patrones de bandas obtenidos a partir de la digestión de moléculas de ADN de diferentes individuos, que han sido sometidas a digestión con las mismas enzimas de restricción. La identificación y comparación de los patrones de bandas se realiza luego de una corrida electroforética en un gel de agarosa o poliacrilamida que permite separar las bandas por tamaño (Figura 3.4).

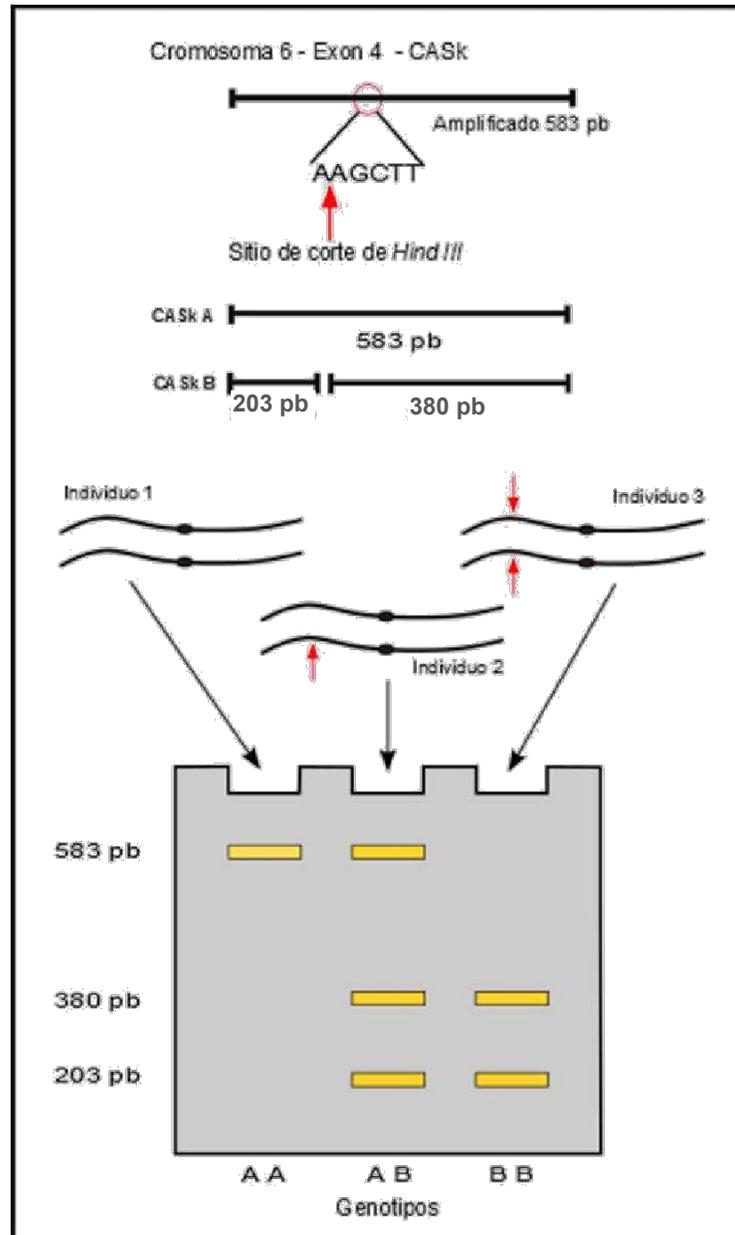


Figura 3.4: Descripción esquemática de la técnica de PCR-RFLP.

3.4.2. PCR-STRs. PCR de repeticiones cortas en tandem (STR, del inglés short tandem repeat)

La técnica de la PCR no sólo permite amplificar y analizar genes estructurales, sino que también permite amplificar y estudiar STR (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Estas secuencias no codificantes se encuentran ampliamente distribuidas por todo el genoma, son altamente polimórficas y además poseen herencia mendeliana. Asimismo, presentan un buen poder de discriminación y facilidades para ser amplificadas de forma simultánea con PCR multiplex, es decir que se pueden amplificar varios sistemas STR simultáneamente a partir de la misma muestra.

Los microsatélites o STRs consisten en repeticiones en tándem o continuas de dos, tres o cuatro nucleótidos (por ejemplo la repetición del dinucleótido AT). En el caso de estos loci, la diferencia entre los alelos está dada por variaciones en el número de repeticiones, así por ejemplo, en un individuo X el dinucleótido (AT) puede estar repetido 7 veces en un lugar específico (locus) de determinado cromosoma, y 9 veces en el mismo locus del cromosoma homólogo (Georges et al., 1991; Kemp et al., 1991; Brezinsky et al., 1992, 1993a, 1993b; Swarbrick et al., 1990; Vaiman et al., 1994; Avraham et al., 1993; Ciampolini et al., 1993, 1995; Ellegren, 1993; Goudarzi et al., 1993; Steffen et al., 1993; Sun et al., 1993a, 1993b, 1994a, 1994b; Sunden et al., 1993). El individuo X presentaría el genotipo 7-9 para el STR analizado.

La técnica de PCR-STR se basa en la amplificación de los microsatélites mediante la utilización de cebadores adyacentes a dicha secuencia. Los productos de la PCR pueden someterse a electroforesis en geles de poliacrilamida o bien pueden detectarse las distintas variantes mediante la utilización de secuenciadores automáticos. En el primer caso se realiza la amplificación de los STRs de interés seguida de una corrida electroforética en geles desnaturizantes. Las diferentes bandas, correspondientes a los fragmentos con distinto número de repeticiones, se visualizan posteriormente mediante tinción del gel con

3.4.3. PCR-SNPs. PCR de polimorfismos de nucleótido simple (SNP, del inglés single nucleotide polymorphisms)

Dentro de las metodologías que se están utilizando actualmente, deben mencionarse las técnicas de análisis de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Este tipo de polimorfismo consiste en el cambio de un nucleótido por otro (transición o transversión) dentro de una secuencia determinada de ADN, es decir que cada SNP posee usualmente dos nucleótidos alternativos en una posición determinada. El hecho que los SNPs se encuentren distribuidos a lo largo de todo el genoma, sean marcadores bialélicos de herencia codominante y tiendan a ser relativamente estables, los hace marcadores biológicos de excelentes características. Otra particularidad de interés de los SNPs es su baja tasa mutacional, lo que los hace marcadores ideales para estudios de paternidad. Si bien los marcadores más ampliamente utilizados dentro de la genética forense son los STRs, en los casos de muestras de ADN muy degradadas o con escasa cantidad, los marcadores más apropiados son los SNPs, ya que como el polimorfismo sólo afecta una base, la posibilidad de que la mutación esté intacta en material muy degradado es alta.

Por otra parte, la simplicidad de los SNPs los hace susceptibles de análisis a gran escala y particularmente de análisis con chips o microarreglos de ADN. Actualmente, los SNPs se están utilizando para la resolución de casos complejos de parentesco o de identificación dado que cuando las muestras se encuentran muy degradadas los STRs no funcionan. Otra de las grandes utilidades de los SNPs es la determinación del origen geográfico de una muestra biológica y también la determinación de ciertas características físicas. Sin embargo, los SNPs tienen también limitaciones, por ejemplo el número de SNPs que se necesitan para realizar un estudio es alrededor de cuatro veces el número de STRs que serían necesarios (Sobrino et al., 2005).

En animales domésticos aún no se han llevado a cabo estudios tan extensivos como en humanos; sin embargo, los datos disponibles

indican que existiría una alta densidad de SNPs en las regiones que han sido estudiadas. Los estudios realizados en animales domésticos para la detección de SNPs se enfocan principalmente hacia el análisis de marcadores genéticos potencialmente asociados a caracteres de producción (genes candidatos). Sin embargo, la información que se está obteniendo a partir de estos polimorfismos resulta de utilidad tanto para ser aplicada en programas de selección como así también en identificación genética (trazabilidad, abigeato) y en farmacogenética.

No existe un método ideal para la tipificación de los SNPs, por lo tanto, la selección de una técnica apropiada depende de los requerimientos del investigador. Para comprender las técnicas de tipificación de SNPs se debe tener en cuenta que existen distintas reacciones para discriminar alelos, diversos métodos de detección de los alelos discriminados y diferentes formatos de ensayo. A continuación se describen algunas de las técnicas más utilizadas para el estudio de los SNPs:

3.4.3.i. AS-PCR. PCR alelo-específica (AS, del inglés allele specific)

Esta metodología permite discriminar las variantes alélicas de un marcador basándose en la utilización de dos cebadores, cada uno específico para un alelo determinado y un cebador común (David y Deuhtch, 1992). Los cebadores alelo-específicos se diferencian en una base para que sólo se unan a la mutación específica. Para cada individuo analizado se realizan dos PCR simultáneas en las que se incluyen el mismo ADN molde, pero mientras en un tubo se agrega un cebador específico para uno de los alelos más el cebador común, en el otro tubo se añade el cebador complementario al otro alelo y además el oligonucleótido común. Los productos de PCR se someten a electroforesis y se determina el genotipo del individuo en estudio de acuerdo a la presencia o ausencia de las bandas correspondientes a cada reacción (Figura 3.6).

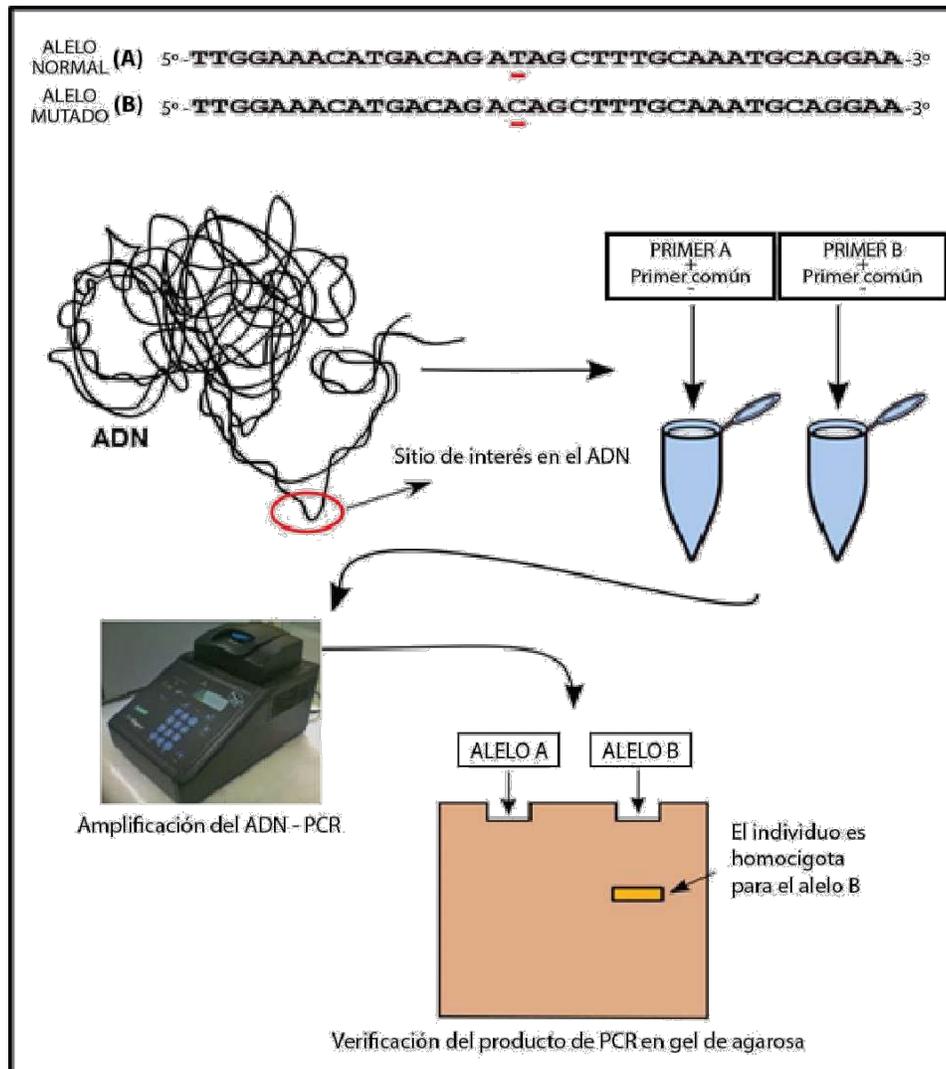


Figura 3.6: Descripción esquemática de la técnica de AS-PCR.

3.4.3.ii. ASO-PCR. PCR de oligonucleótidos específicos de alelos (ASO, del inglés allele specific oligonucleotide)

La hibridación con sondas u oligonucleótidos alelo-específicos es una técnica que permite discriminar las variantes de un marcador determinado mediante la utilización de sondas alelo-específicas marcadas con fluorescencia. Esta técnica permite distinguir fragmentos de ADN que sólo difieren en una base. Para poder realizar este tipo de

reacciones es necesario diseñar dos sondas, una específica para cada alelo. Los oligonucleótidos tienen un tamaño de 15 a 20 pb y generalmente la base polimórfica se ubica en el centro de cada sonda. En condiciones óptimas de hibridación, los híbridos ADN - sonda complementaria serán estables, mientras que los híbridos que difieran en una base serán inestables. Los genotipos pueden inferirse a partir de las señales de hibridación que sólo serán emitidas por los híbridos estables.

El principio empleado para la detección de los híbridos estables es el de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*). En este caso, la fluorescencia se emite como resultado de un cambio en la distancia física entre un colorante fluorescente llamado donante o *reporter* y una molécula atenuadora de la fluorescencia llamada atenuador o *quencher*. Estas dos moléculas se encuentran en la sonda. Si la sonda no se une al ADN molde por falta de complementariedad, no se produce emisión de fluorescencia, ya que el colorante y el atenuador se encuentran en posiciones cercanas. En el caso que la sonda sea complementaria al ADN, se une al mismo y de esta manera se incrementa la distancia entre el *reporter* y el *quencher*. De este modo, la molécula atenuadora de la fluorescencia no puede actuar sobre la molécula fluorescente y esto permite la emisión y consiguiente detección de la fluorescencia.

Entre las técnicas desarrolladas para tipificar SNPs utilizando este tipo de reacciones, podemos mencionar la detección de actividad exonucleásica (TaqMan) y las guías moleculares:

1. Detección de actividad exonucleásica (TaqMan): Esta técnica aprovecha la actividad exonucleásica 5' de la Taq polimerasa que elimina los nucleótidos desde el extremo 5' de una sonda unida a un fragmento de ADN a medida que avanza la polimerización desde un cebador, generando de esta manera una señal fluorescente (Holland et al., 1991; Livak et al., 1995; Sobrino et al., 2005). Su mecanismo de acción es similar al videojuego PacMan, de ahí su nombre. En este caso

se utiliza un cebador común y dos sondas que difieren en sólo una base, cada una complementaria a un alelo. En los extremos de las sondas se encuentran los colorantes fluorescentes, el *reporter* en un extremo y el *quencher* en el otro. La metodología consiste en permitir que se unan al fragmento de ADN molde un cebador y la sonda complementaria con el colorante fluorescente, con un espacio entre ambos de manera que pueda actuar la polimerasa. Se realiza entonces una PCR y a medida que avanza la polimerización a partir del cebador hacia la sonda, la Taq polimerasa también realiza una actividad exonucleásica 5'→ 3' que degrada a la sonda. De esta manera, el colorante fluorescente se separa de la molécula atenuadora y comienza a emitir fluorescencia, ya que a medida que aumenta la distancia entre las dos moléculas el atenuador deja de actuar y permite que el colorante emita fluorescencia. La emisión de fluorescencia sólo ocurre si la sonda es específica para uno de los alelos; de lo contrario no se detecta ningún tipo de emisión debido a que la sonda, al no ser complementaria, no se une al ADN en estudio (Figura 3.7).

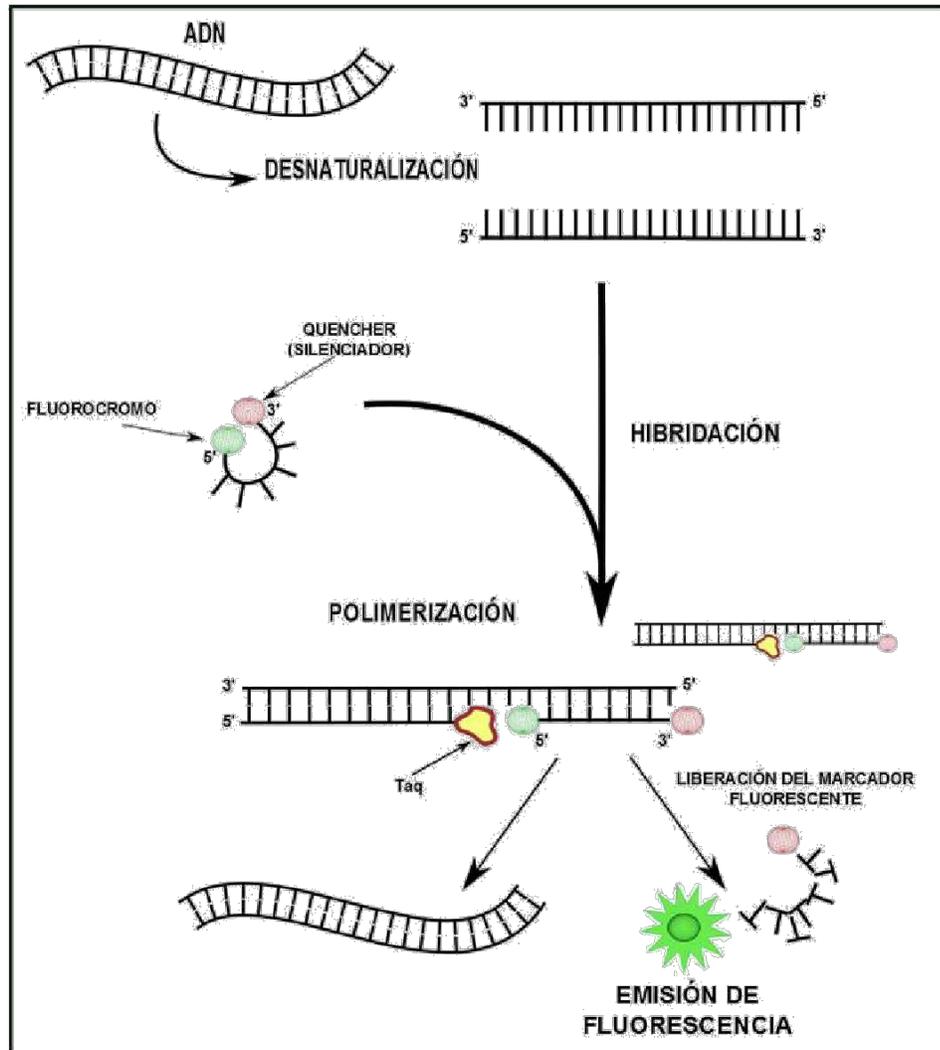


Figura 3.7: Descripción esquemática de la técnica de detección de actividad exonucleásica (TaqMan).

2. Guías moleculares (*Molecular beacons*): Para esta técnica se utilizan sondas que son complementarias al fragmento de ADN en el que se encuentra la mutación de interés. Estas sondas poseen en ambos extremos secuencias que son complementarias entre sí, y que a su vez llevan un marcador fluorescente en el extremo 5' y un atenuador en el 3'. Debido a la presencia de esas secuencias complementarias en los extremos, la sonda adquiere una configuración de bucle cuando no hibrida con el ADN blanco, razón por la cual la molécula fluorescente está inhibida por el atenuador y no se produce emisión de fluorescencia.

Cuando la sonda se aparea correctamente con el ADN analizado, el marcador y el atenuador se separan produciéndose la emisión de fluorescencia (Tyagi y Kramer, 1996; Sobrino et al., 2005). Para la tipificación de los SNPs deben utilizarse sondas específicas para cada alelo, marcadas con colorantes fluorescentes diferentes (Figura 3.8).

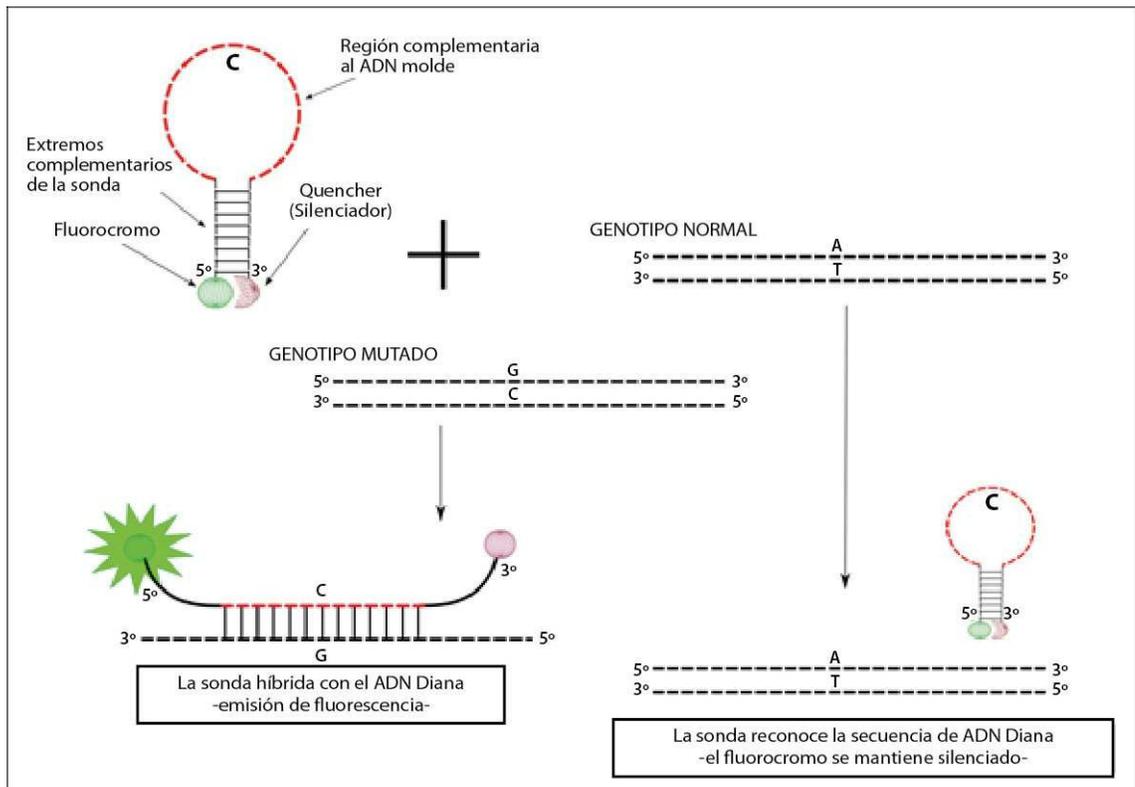


Figura 3.8: Descripción de la técnica de guías moleculares (*Molecular beacons*).

3.4.3.iii. Microarreglos de ADN

Los microarreglos de ADN, también llamados microarrays de ADN o chips de ADN, representan una tecnología de alto rendimiento que ha revolucionado en los últimos años distintas áreas de la investigación, incluida la genética forense (Kobilinsky, 2011). Los microchips surgen como consecuencia de una combinación entre técnicas

microelectrónicas empleadas para la fabricación de microprocesadores informáticos y materiales biológicos. La gran ventaja de esta metodología es que permite el análisis simultáneo de un gran número de moléculas de ADN en muy poco espacio.

Un microarreglo consiste básicamente en una superficie sólida del tamaño de un portaobjetos, generalmente de vidrio, sílice o plástico, a la cual se fijan pequeñas gotas que contienen fragmentos cortos de ADN o sondas (20 a 50 pb). El tamaño de las gotas es del orden de los micrómetros. Las sondas tienen una secuencia conocida y quedan inmovilizadas sobre la superficie sólida en posiciones conocidas. Sobre estos arreglos de sondas se hibrida el ADN que necesita ser evaluado. Estos chips permiten detectar desde cientos a cientos de miles de marcadores (Figura 3.9).

Dentro de los chips de ADN, encontramos los microarreglos de SNPs y de STRs. Estos resultan de utilidad dentro del área de la genética forense ya que permiten realizar perfiles de la muestra en evaluación. Ambos tipos de microarreglos han sido utilizados tanto en humanos como en animales para establecer relaciones de parentesco entre individuos y para efectuar estudios de identificación, con resultados exitosos (Divne et al., 2005; Li et al., 2006; Teletchea et al., 2008; Rönn et al., 2009; Park et al., 2010; Kling et al., 2012; Ziętkiewicz et al., 2012).

El funcionamiento de los microarreglos se basa en la capacidad de las moléculas complementarias de ADN de hibridar entre sí. Básicamente, se utilizan dos métodos de tipificación, un método se basa en la hibridación específica de alelos y el otro en la extensión de la sonda inmovilizada que actúa como un cebador, con dNTPs marcados con fluorescencia. En el primer caso las sondas fijadas en el chip representan todas las posibles variantes de un determinado sitio polimórfico; de este modo el ADN en estudio sólo se unirá a la sonda con la que la coincidencia sea exacta. Luego el microarreglo es escaneado para poder medir la fluorescencia y la mutación se identifica

de acuerdo a la señal fluorescente emitida. En este caso, el principio empleado es el de las sondas ASO descritas anteriormente.

En el segundo caso, la tipificación se basa en la extensión de la sonda usando como molde al ADN en estudio. Los cuatro nucleótidos, que contienen diferentes marcas fluorescentes, se añaden junto con la ADN polimerasa. La base incorporada, que es complementaria a la base ubicada en el sitio polimórfico del ADN molde, se identifica por la naturaleza de su señal fluorescente. En este caso el microarreglo también es escaneado para detectar la fluorescencia.

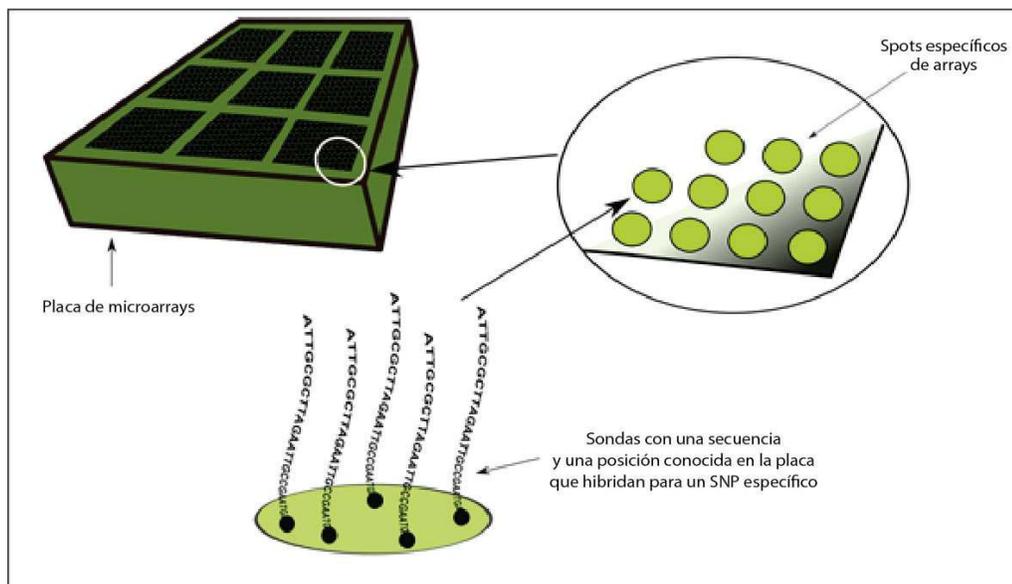


Figura 3.9: Descripción esquemática de la técnica de microarreglos.

3.4.3.iv. Minisequenciación (Minisequencing primer extension)

Esta metodología se basa en la utilización de un cebador cuyo extremo 3' se ubica junto a la base que precede al SNP o mutación que define una variante alélica. La ADN polimerasa sólo extiende al cebador en una base (*single-base extension primer*), es decir que sólo se incorpora un nucleótido que es complementario a la mutación (Syvanen

et al., 1990; Sokolov 1990). Mediante esta técnica pueden detectarse varios SNPs simultáneamente (*multiplex reaction*). En este caso es necesario diseñar cebadores específicos para cada SNP analizado. La minisequenciación es utilizada en genética forense para la identificación de haplogrupos del ADN mitocondrial (La Neve et al., 2007; Daca et al., 2008).

Existen distintas técnicas que permiten analizar los productos de extensión del cebador, entre ellas pueden mencionarse la electroforesis y detección de fluorescencia, la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y microarreglos.

1. Electroforesis y detección de fluorescencia (SNaPshotTM): Para lograr la extensión del cebador ubicado junta a la mutación se agrega una ADN polimerasa y ddNTPs marcados con cuatro colorantes fluorescentes. Luego los productos de la reacción se separan mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ADN (Figura 3.10).

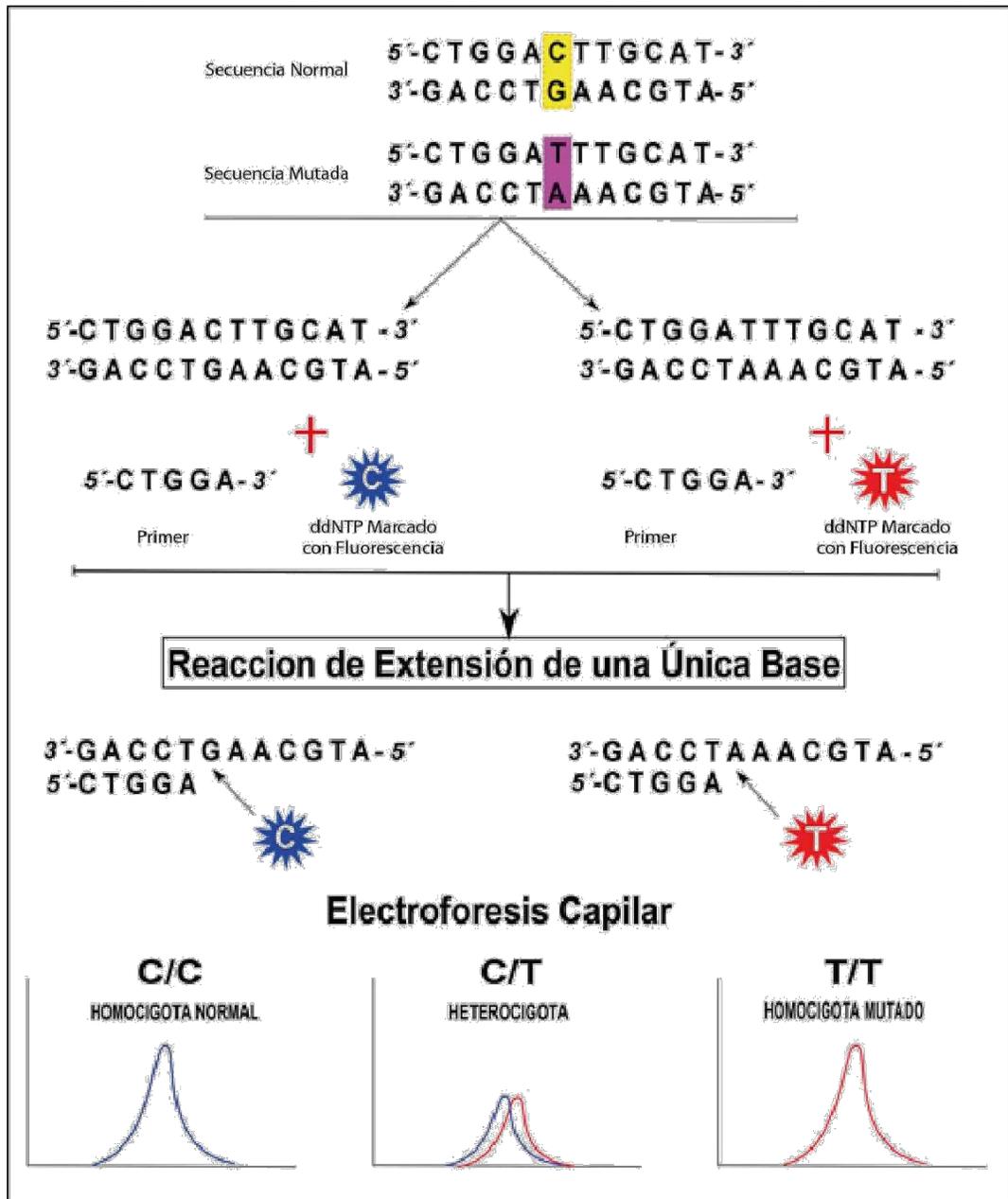


Figura 3.10: Descripción esquemática de la técnica de minisequenciación (SNaPshot™).

2. Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS): esta técnica mide el peso molecular de los productos obtenidos a partir de una minisequenciación. La masa precisa del producto de la reacción varía de acuerdo al tipo de dNTP incorporado, ya que cada nucleótido presenta

un peso molecular diferente. En este caso no es necesario marcar los nucleótidos, pero sí es preciso disponer de equipos automatizados y además debe asegurarse la pureza de la muestra sometida al ensayo.

3. Extensión de cebadores fijados a un chip (APEX, del inglés *arrayed primer extension*): Otra forma de detectar el nucleótido incorporado durante una minisequenciación es mediante el uso de microarreglos. En este caso los cebadores se fijan a la matriz y son extendidos mediante una polimerasa que incorpora ddNTPs marcados. Como molde se utiliza el ADN bajo estudio. Posteriormente el microarreglo se escanea para medir la emisión de fluorescencia.

3.4.3.v. Pirosecuenciación

Esta tecnología también se utiliza para el estudio de SNPs y se basa en la ocurrencia de una cascada de reacciones enzimáticas que producen la emisión de luz cada vez que se incorpora un nucleótido al ADN molde. Mediante la actividad de una polimerasa se van incorporando nucleótidos a partir de un cebador unido a un ADN molde. Cada vez que se incorpora un nucleótido complementario a la cadena molde se libera un pirofosfato (PPi) que se transforma en ATP por acción de una ATPsulfurilasa. El ATP es entonces utilizado por la enzima luciferasa para producir un pico de luz que es captado por una lente. Los nucleótidos no incorporados son degradados por una enzima llamada apirasa para que no afecten las reacciones de incorporación sucesivas. La incorporación de cada nucleótido se registra en un pirograma en el cual se puede leer la secuencia del ADN molde. La gran ventaja de este método es que se puede detectar cualquier nuevo polimorfismo y analizar un gran número de individuos simultáneamente. La desventaja es que se requiere de un equipamiento automatizado específico (Figura 3.11).

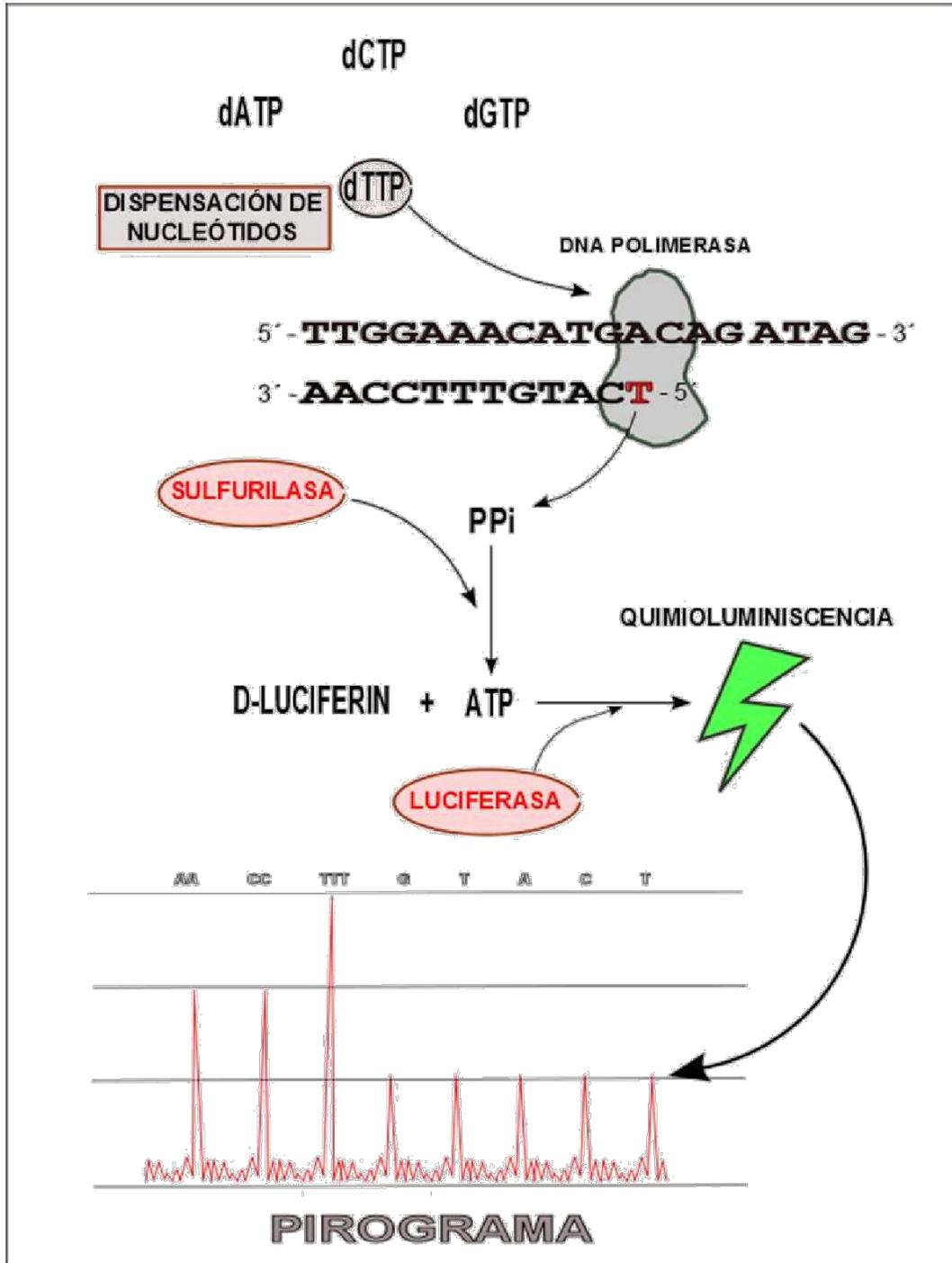


Figura 3.11: Descripción esquemática de la técnica de pirosecuenciación.

3.4.4. PCR-Secuenciación

En el año 1977, Maxam y Gilbert (1977) y Sanger et. al. (1977) desarrollaron dos métodos para poder determinar la secuencia de un fragmento de ADN. Si bien ambos métodos son muy similares, la metodología más comúnmente utilizada es el método enzimático de Sanger. Esta técnica se basaba originalmente en la extensión específica de la cadena de ADN a partir de un cebador, mediante la acción de la ADN polimerasa que incorpora dNTPs en la cadena en formación. Además, a la mezcla de reacción se le agrega ddNTPs que carecen de un residuo -OH en la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos se incorporan a la cadena en crecimiento por medio del trifosfato presente en posición 5', pero al carecer del hidroxilo en la posición 3' no pueden formar enlaces fosfodiéster con nucleótidos sucesivos y la cadena queda interrumpida. La técnica original consiste en realizar cuatro reacciones de polimerización diferentes, en las cuales debe incluirse el fragmento de ADN que se desea secuenciar, dNTPs convencionales que sí llevan el residuo -OH en posición 3' y los ddNTPs. La diferencia entre las cuatro reacciones es que una lleva ddATPs, otra ddTTPs, la tercera ddCTPs y la cuarta ddGTPs. De este modo, los dNTPs y los ddNTPs compiten entre ellos generando poblaciones de oligonucleótidos terminados en A, C, G o T (Sambrook et al., 1989). Los fragmentos obtenidos, que difieren en la última base, se separan mediante electroforesis en geles. Posteriormente la secuencia se determina leyendo el gel de abajo hacia arriba. De esta manera se logra conocer la secuencia del fragmento original (Figura 3.12).

Actualmente, la secuenciación se realiza en equipos automatizados que utilizan los mismos principios básicos establecidos por Sanger et al. (1977) pero empleando los cuatro ddNTPs en una misma reacción, los cuales se diferencian porque son marcados con cuatro fluorocromos distintos que luego son excitados por un láser leídos para que puedan ser detectados por el equipo. De esta manera los secuenciadores

automáticos generan un electroferograma de cuatro colores en el que cada pico representa a cada una de las cuatro bases del ADN.

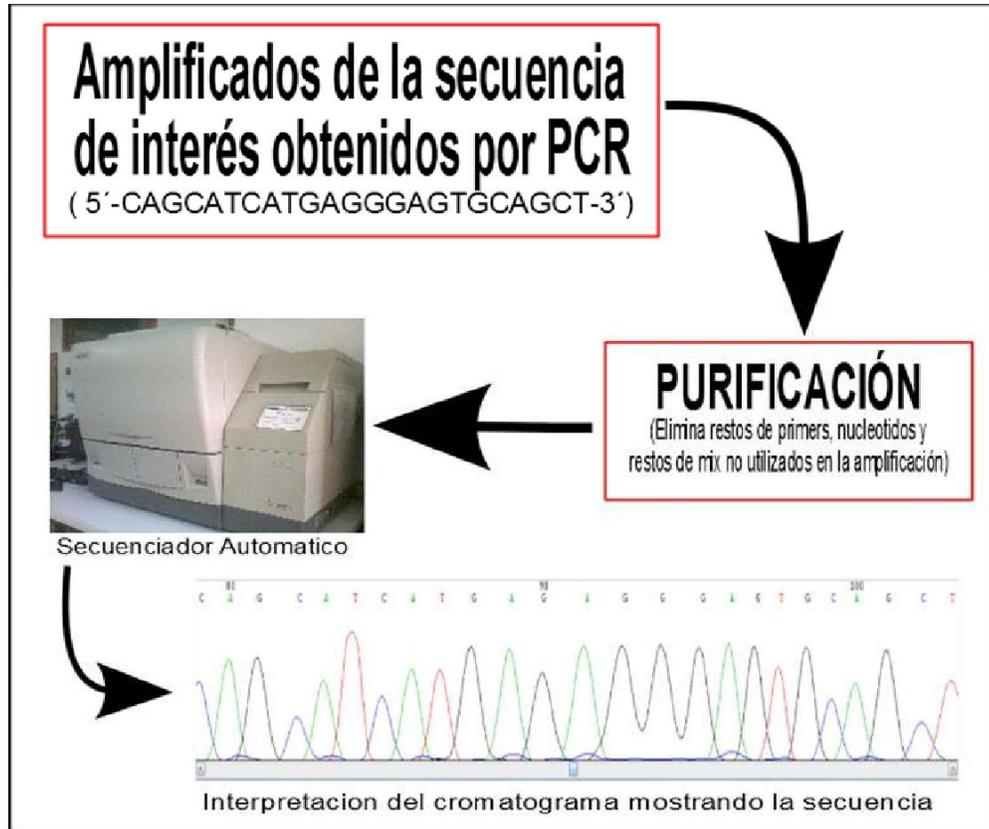


Figura 3.12: Descripción esquemática de la técnica de PCR-secuenciación.

3.5. PCR cuantitativa y Genética Forense

En 1993, Higuchi perfeccionó la metodología convencional de PCR adicionando una videocámara al termociclador que actuaba en el mismo momento en que se estaba produciendo la amplificación. La cámara captaba la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio al intercalarse con las hebras recién sintetizadas. La cantidad de fluorescencia emitida era directamente proporcional a la cantidad de ADN producido por la PCR dando la posibilidad de medir en tiempo real dicha amplificación. Esta metodología es conocida como PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en

tiempo real (RT-PCR), aunque se ha ido modificando la forma en que se emite la fluorescencia.

Dada las bajas cantidades de ADN usualmente encontradas en las evidencias biológicas forenses, determinar la cantidad de ADN humano, animal o vegetal extraído de una muestra de la escena del crimen es un paso crucial en el análisis. Este dato no sólo es necesario para optimizar las condiciones de reacción sino también para minimizar el consumo de la muestra. Actualmente, muchos laboratorios de genética forense cuentan con esta tecnología debido a la importancia de conocer la cantidad de ADN con la que se cuenta para realizar la amplificación. Además, en muchos casos, es necesario conocer si se está en presencia o no de inhibidores de la amplificación y esto también puede determinarse por esta técnica.

Si bien actualmente existen kits comerciales basados en qPCR para uso en genética forense humana (Nicklas et al., 2003), hasta el momento no existen kits comerciales disponibles para cuantificar ADN animal o vegetal. Sin embargo, se han publicado metodologías desarrolladas mediante sondas TaqMan para cuantificar el ADN en caninos, felinos, equinos y bovinos (Evans et al., 2007; Lindquist et al., 2011; Kanthaswamy y Premasuthan, 2012; Kanthaswamy et al., 2012) y productos vegetales (Johnson et al., 2013). Estas técnicas resultan de gran utilidad ya que muchas veces es necesario cuantificar con precisión en casos de forense animal o vegetal, como por ejemplo, en ataques de una especie a otra, o para evaluar la contribución de una especie en la manufactura de alimentos.

3.5.1. Fundamentos de la PCR cuantitativa

Durante la amplificación de ADN por PCR, la cantidad de templado se duplica con cada ciclo, por lo tanto la cantidad de producto (**P**), luego de un ciclo será:

$$P = (2)^n T$$

siendo **T** el tiempo transcurrido. En consecuencia, existe una relación exponencial entre la cantidad de producto amplificado y la cantidad de templado original. Esto se cumple sólo durante la fase exponencial de la reacción, cuando los reactivos no son limitantes y la formación de producto es proporcional a la cantidad de templado original. La relación exponencial existente se va a mantener duplicando el ADN en cada ciclo, y **P** va a depender tanto del ADN original a cuantificar (**X**) como de la eficiencia de la reacción (**Er**) será:

$$P = X(1+Er)^n$$

Para poder realizar la medición del producto se deben utilizar estándares de ADN con cantidades conocidas, y así poder extrapolar los datos desconocidos. El umbral (*threshold*) es un punto dentro de las curvas de calibración que se toma para determinar cuántos ciclos tardará una determinada muestra en alcanzar una determinada cantidad de producto **Y**. El número de ciclos que una muestra tarda en alcanzar una determinada cantidad de producto se denomina **Ct** (Figura 3.13).

A mayor concentración de ADN en la muestra, más rápidamente se alcanzara el umbral y el **Ct** será menor. Por lo tanto, existe una relación exponencial entre la cantidad de producto amplificado y la cantidad de ADN del templado original:

$$Y = X(1+Er)^n$$

siendo **Y** el producto amplificado en cada ciclo; durante la fase exponencial **Er** se mantiene relativamente constante y el producto (**Y**) es función de la cantidad de ADN molde (**X**).

Cabe destacar que se puede realizar el análisis de varios *targets* o secuencias blanco a la vez utilizando sondas marcadas con diferentes fluoróforos. Esta técnica se conoce como Multiplex qPCR.

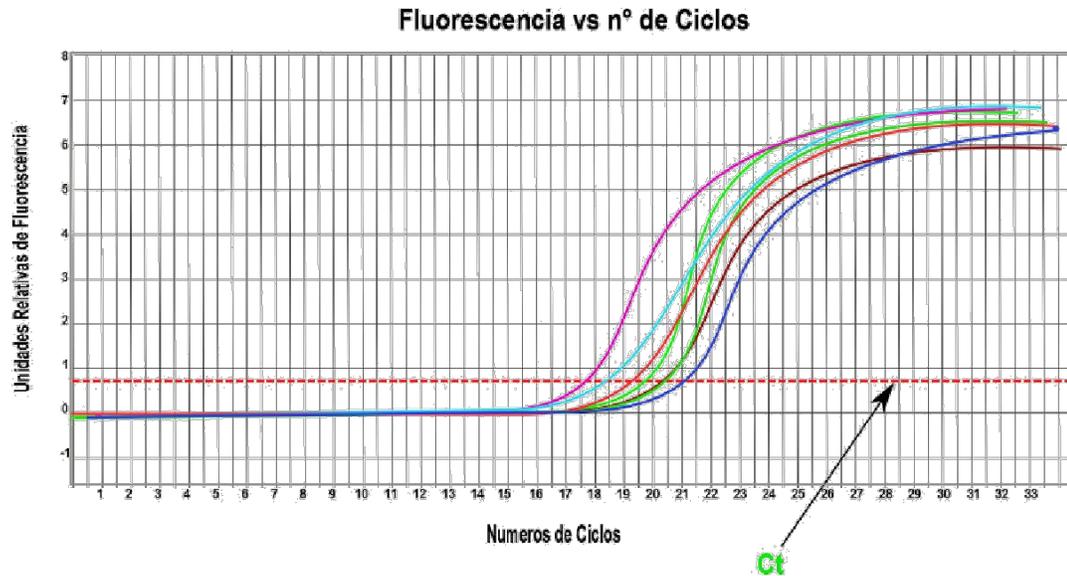


Figura 3.13: Curvas de amplificación obtenidas mediante la técnica de PCR cuantitativa.

3.5.2. Métodos de detección

Los métodos de detección son variados, pero todos ellos se basan en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre dos moléculas. De este modo, el incremento del ADN en cada ciclo es proporcional a la cantidad de la fluorescencia emitida. En genética forense las sondas TaqMan son la metodología más utilizada para la cuantificación del ADN, dada su gran especificidad. Por otro lado, los agentes intercalares como el *SYBR Green I* son también muy utilizados dada la facilidad en optimizar las condiciones de reacción.

3.5.2.i Agentes intercalares

Los agentes intercalares son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en RT-PCR es el *SYBR Green I*, cuya ventaja radica en que la optimización de las condiciones de reacción es

fácil y económica. El inconveniente de su utilización reside en que los agentes intercalares tienen baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta tanto a los productos específicos como a los generados inespecíficamente o a los dímeros de cebadores, que son muy frecuentes en la PCR.

3.5.2.ii Sondas de hidrólisis: TaqMan

Como se mencionó anteriormente, el principio de las sondas TaqMan se basa en la actividad de exonucleasa 5'-3' de la enzima Taq polimerasa. El fundamento de esta metodología radica en que al escindir una sonda marcada con un fluorocromo donante en el extremo 5' (que emite fluorescencia al ser excitado) y un aceptor en el extremo 3' (que absorbe la fluorescencia liberada por el donador al estar ambas moléculas espacialmente próximas) se produce la emisión de fluorescencia.

Durante la amplificación, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. La actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donante. Este último, al encontrarse espacialmente alejado del aceptor, puede emitir fluorescencia que es captada por el lector (Figura 3.7). Al igual que en otros métodos de RT-PCR, la señal de fluorescencia resultante permite mediciones cuantitativas de la acumulación del producto durante las etapas exponencial de la PCR. La ventaja de las sondas TaqMan es que aumentan significativamente la especificidad de la detección, dado que están diseñadas para hibridar dentro de una región de ADN amplificada por un conjunto específico de cebadores. Por lo tanto, la utilización de estas sondas es ventajosa ya que resulta una metodología sensible, precisa y reproducible.

3.6. Técnicas de secuenciación masiva (NGS, del inglés *Next generation sequencing*)

La secuenciación a gran escala ha sido revolucionada en los últimos años por el desarrollo de varias tecnologías de secuenciación masiva (NGS). Cuando hablamos de técnicas de secuenciación masiva nos referimos a la secuenciación simultánea de millones de fragmentos pequeños de ADN, lo que permite crear una colección masiva de datos. Cada colección de datos puede alcanzar tamaños del orden de los gigabytes, lo que es equivalente a 1 billón (1.000.000.000) de pares de bases de ADN. Comparando estas nuevas tecnologías con la secuenciación de primera generación (secuenciación automática de Sanger), esta última podía secuenciar un fragmento de ADN por vez, generando quizás entre 500 a 1000 pares de bases de ADN en una única reacción (Metzker, 2010). Por lo tanto, este desarrollo ha incrementado drásticamente el número de bases obtenidas en cada secuenciación, y al mismo tiempo ha disminuido el costo de cada base secuenciada.

Las técnicas de secuenciación masiva son ventajosas en ciertos aspectos, entre los que podemos destacar que proveen alternativas de alto rendimiento mucho más económicas que la secuenciación de Sanger. Por lo tanto, se puede secuenciar un genoma completo en un solo día. Como consecuencia de estas características favorables, la secuenciación de alto rendimiento de genomas facilitó, entre otros, el descubrimiento de genes y elementos regulatorios asociados con enfermedades, la identificación de mutaciones causantes de patologías, así como información del transcriptoma completo (secuenciación del ARNm) de una muestra en un único análisis, sin requerir el conocimiento previo de la secuencia genética de un organismo.

Como desventajas, en vías de solución, podemos mencionar que para algunos laboratorios las plataformas para NGS aún pueden ser muy costosas. En forma adicional, el análisis de los datos puede llevar mucho

tiempo y puede requerir conocimientos especiales de bioinformática para obtener información adecuada de los datos de las secuencias. Quizás el mayor desafío al que se enfrentan los laboratorios de genética es el manejo y almacenamiento de las grandes cantidades de datos de secuencia que se generan por NGS, que pueden alcanzar a 600 gigabytes en una sola corrida (equivalente a alrededor de 90.000 canciones en un reproductor mp3).

Este desafío del conocimiento y aplicación de la bioinformática ha dado lugar al desarrollo de plataformas y programas que brindan soluciones crecientes para el tratamiento del formato de los datos, el ensamble *de novo* de las secuencias, el mapeo de lecturas en referencia a un genoma, la cuantificación y detección de variantes de secuencia y, fundamentalmente, el almacenamiento de los datos (Grada y Weinbrecht, 2013).

La primer tecnología NGS que estuvo disponible comercialmente fue el secuenciador genómico Roche/454 (454 Life Sciences, Branford, CT; Margulies et al., 2005). Mientras que los primeros equipos podían entregar longitudes de lectura de alrededor de 100 bases, la generación actual de instrumentos alcanza lecturas de más de 400 bases.

Todas las tecnologías NGS disponibles difieren de la secuenciación automática de Sanger en que no requieren el clonado del molde de ADN en vectores bacterianos. En la mayoría de las estrategias de NGS el molde de ADN se fragmenta, se une a un sustrato y se amplifica por PCR para generar representaciones clonales de los fragmentos originales que son separados espacialmente para la reacción de secuenciación subsecuente (Nowrousian, 2010). La secuenciación en sí misma se logra mediante un cierto número de métodos que hacen uso de diferentes enzimas (ligasas o polimerasas) y de diversas propiedades químicas para generar señales lumínicas que son registradas por métodos de detección altamente sensibles. Un aspecto común de todas las tecnologías NGS es el alto grado de simultaneidad, dado que tienen

lugar millones de reacciones de secuenciación al mismo tiempo y en pequeños volúmenes de reacción (Figura 3.14).

En la actualidad existen tres tecnologías NGS principales: el Analizador Genómico de Illumina (Solexa), el Ion Torrent y el Pirosecuenciador Roche/454 FLX. Si bien la forma en que cada plataforma NGS ejecuta la secuenciación de ADN es única, los distintos sistemas poseen aspectos comunes (Metzker, 2010). Generalmente inician el proceso fragmentando el ADN genómico al que se unen oligonucleótidos adaptadores; estas moléculas son amplificadas clonalmente para la secuenciación en paralelo de millones o billones de lecturas. Para dimensionar comparativamente, con la secuenciación de Sanger se necesitaron billones de dólares y 15 años de trabajo para completar un único genoma en el proyecto Genoma Humano (HGP, del inglés *Human Genome Project*). No obstante, esta metodología aún se utiliza en la mayoría de los laboratorios de investigación y permanece como una herramienta clave para la verificación de clones y la secuenciación basada en PCR (Mardis, 2008; Ansorge y Wilhelm, 2009).

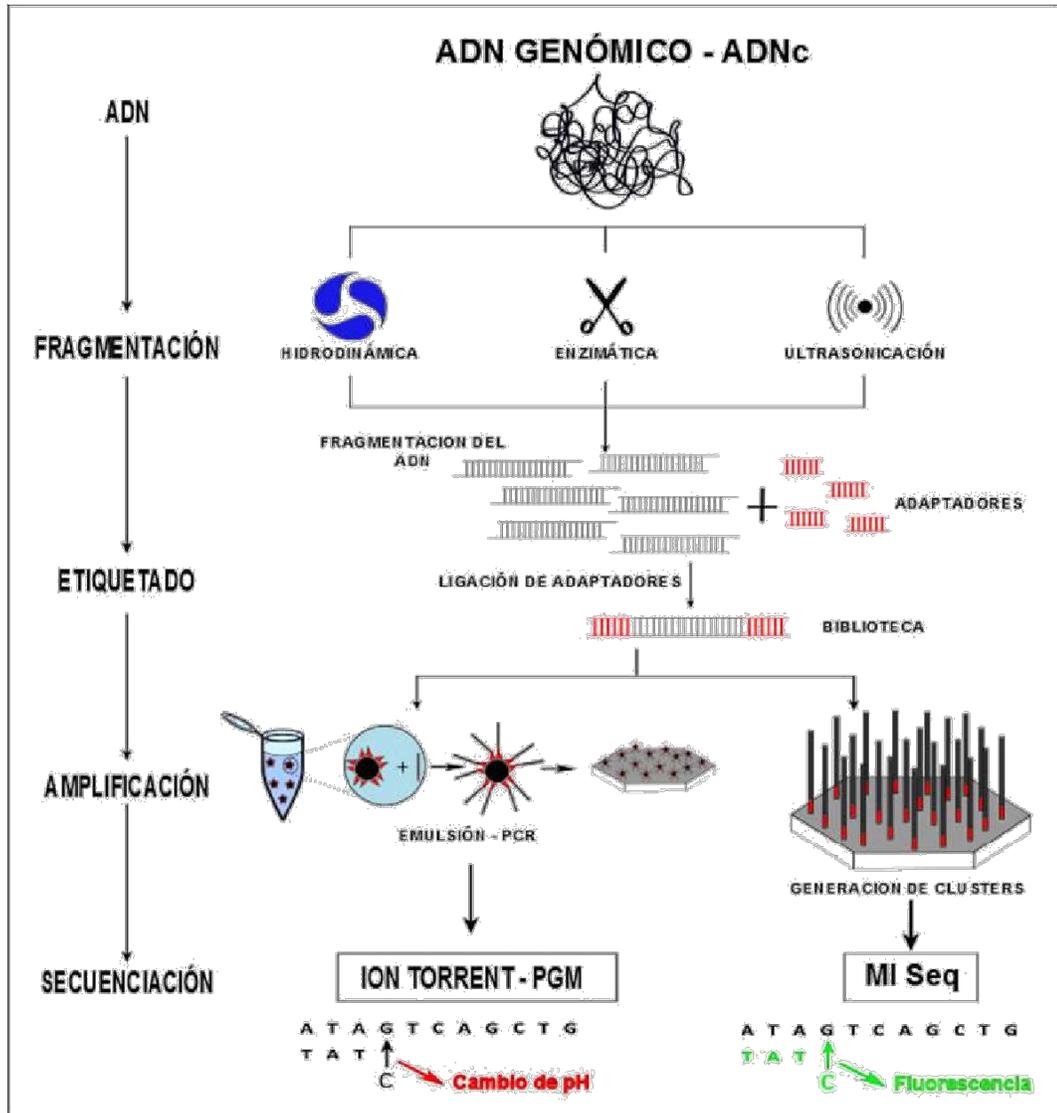


Figura 3.14: Descripción esquemática de la técnica de secuenciación masiva (NGS).

3.6.1. Aplicaciones de las tecnologías NGS

La tipificación genética tradicional implica el análisis paso a paso de un número de genes, para tratar de identificar dónde se encuentra la alteración genética. Un ejemplo que ilustra esta situación es la tipificación genética en casos de cáncer hereditario donde usualmente se secuencian dos genes, BRCA1 y BRCA2, en búsqueda de

alteraciones en los pacientes afectados. Esto puede requerir la secuenciación de más de 60 fragmentos de ADN para identificar dónde puede estar presente un único cambio de bases en el ADN. En contraste, usando NGS estos genes pueden ser secuenciados juntos en un solo test, mostrando claramente el potencial de la tecnología NGS de brindar información en numerosos genes de una sola vez. Otro ejemplo interesante es el caso de los numerosos genes involucrados en el desarrollo de tumores, tales como el cáncer de pulmón. El análisis del perfil molecular de una muestra del tumor utilizando NGS puede llevar a identificar una alteración que podría utilizarse para definir la mejor opción del tratamiento con drogas para un paciente.

Las aplicaciones de las tecnologías NGS son múltiples, entre ellas pueden mencionarse la secuenciación de genomas, el análisis de la organización genómica, el análisis de expresión génica, el estudio de microorganismos eucariotas, así como también para estudios de metagenómica y para la detección de variaciones de secuencia dentro de genomas individuales. En este último caso pueden mencionarse a modo de ejemplo, los SNPs, indels, variantes estructurales, análisis de variación genética individual, dinámica genómica y estudios de expresión. Además, estas tecnologías han sido adoptadas rápidamente para estudios de alto rendimiento que previamente se realizaban por métodos basados en hibridación, tales como los microarreglos. Esto incluye el uso de NGS para transcriptómica (RNA-seq) o análisis de genomas completos de ADN/interacciones proteicas (ChIP-seq).

Una de las aplicaciones más generalizadas de las técnicas de secuenciación con alto rendimiento y a bajo costo es la secuenciación de genomas. Podemos distinguir entre la resecuenciación, es decir la secuenciación de genomas de una especie cuando ya hay disponible un genoma de referencia, y la secuenciación *de novo*. La resecuenciación es actualmente una de las mayores áreas de aplicación de NGS. Las plataformas con lecturas cortas pero con alto rendimiento tienen un gran potencial porque con un genoma de referencia disponible, aún las

lecturas relativamente cortas pueden ser mapeadas con un alto nivel de confianza en la secuencia de referencia. Para genomas grandes como los de mamíferos, esta estrategia es muy útil; actualmente ya se han secuenciado genomas individuales de humanos y bovinos con la tecnología NGS (Xia et al., 2012; Derek et al., 2012). Además, las secuencias que son mapeadas con un genoma de referencia pueden emplearse para identificar SNPs, Indels, variaciones en el número de copias (CNV) y variantes estructurales, colaborando de esta manera en la comprensión de las bases genéticas de las diferencias fenotípicas.

3.7. Referencias Bibliográficas

- Ansorge, W.J. (2009) *Next-generation DNA sequencing techniques*. New Biotechnology.
- Avraham, A., Yoffre, M.B., Shani, M., Ron, M. (1993) "Bovine dinucleotide repeat polymorphism at the *aro26* locus", en *Animal Genetics*. Número 24(2), pp. 147.
- Bickhart, D.M., Hou, Y., Schroeder, S.G., Alkan, C., Cardone, M.F., et al., (2012) "Copy number variation of individual cattle genomes using next-generation sequencing" en *Genome Res.*, Número 22(4) pp. 778–790.
- Brezinsky, L., Kemp, S.J., Teale, A. (1993a) "Five polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010-014)" en *Animal Genetics*, Número 24 (1) pp. 74.
- Brezinsky, L., Kemp, S.J., Teale, A. (1992) "ILSTS001: A polymorphic bovine microsatellite" en *Animal Genetics*, Número 23 (1) pp. 81.
- Brezinsky, L., Kemp, S.J., Teale, A. (1993b) "ILSTS005: A polymorphic bovine microsatellite" en *Animal Genetics*, Número 24(1) pp. 73.
- Chehab, E.F., Johnson, J., Louie, E., Goossens, M., Kawasaki, E., Erlich, H. (1991) "A dimorphic 4-bp repeat in the cystic fibrosis gene is in absolute linkage disequilibrium with the $\Delta F508$ mutation: implications for

prenatal diagnosis and mutation origin” en *Am J Hum Genet.*, Número48 pp. 223–226.

Ciampolini, R., Goudarzi, K., Vaiman, D., Leveziel, H. (1993)“A new bovine dinucleotide repeat microsatellite: microsatellite INRA 30” en *Animal Genetics*, Número24(3) pp. 221.

Ciampolini, R., Moazami-Goudarzi, K., Vaiman, D., Dillmann, C., Mazzanti E., Foulley, J.L., Leveziel, H., Cianci, D. (1995) “Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds” en *Journal of Animal Science*, Número 73 pp. 3259–3268.

Corach, D. (2010)“Manual 14vo Curso de Actualización sobre Técnicas Moleculares de Identificación Humana Mediante Análisis de ADN”.SHDG.

Daca, P., Mielnik, M., Rogalla, U., Skonieczna, K., Linkowska, K., Grzybowski, T. (2008) “The application of minisequencing reactions for haplogroup assignment of mitochondrial DNA” en *Arch Med Sadowej Kryminol*, Número 58(4) pp. 212-217.

Damiani, G., Ferretti, L., Rognoni, G., Sgaramelli, V. (1990) “Restriction fragment length polymorphism analysis of the kappa-casein locus in cattle” en *Animal Genetics*, Número21 pp. 107-114.

David, V., Deuhtch, A. (1992) “Detection of α S1-casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction” en *Animal Genetics*, Número 23 pp. 425-429.

Denicourt, D., Sabour, M.P., Mcallister, A.J. (1990) “Detection of bovine -casein genomic variants by the polymerase chain reaction method” en *Animal Genetics*, Número 21 pp. 215-216.

Divne, A.M., Allen, M. (2005) “A DNA microarray system for forensic SNP analysis” en *Forensic Sci Int.*, Número 154(2-3) pp. 111-121.

Ellegren, H. (1993) “Genome analysis with microsatellite markers. Department of animal breeding and genetics” Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

- Evans, J.J., Wictum, E.J., Penedo, M.C., Kanthaswamy, S. (2007) "Real-time polymerase chain reaction quantification of canine DNA" en *J Forensic Sci.*, Número 52(1) pp. 93-96.
- Ford, E.B. (1965) "Polymorphism" en *Biology Reviews*, Numero20 pp. 73 - 88.
- Georges, M., Gunawardana, A., Threagil, ID.W., Lathrop, M., Olsaker, I., et al. "Characterization of a set variable number of tandem repeat markers conserved in bovidae" en *Genomics*, Número11 pp. 24-32.
- Goudarzy, K., Ciampolini, R., Vainman, D., Leveziel, H. (1993) "A new bovine dinucleotide repeat microsatellite: microsatellite INRA 18" en *Animal Genetics*, Número 24(3) pp. 221.
- Grada, A., Weinbrecht, K., (2013) "Next-Generation Sequencing: Methodology and Application" en *Journal of Investigative Dermatology*, Número133 pp.11.
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T. (1982) "Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene" en *Proc Natl Acad Sci USA*, Número 79(19) pp. 5901–5905.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993) "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions" en *Biotechnology*, Número 11(9) pp. 1026-1030.
- Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand (1991) "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase" en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Número 88 pp. 7276–7280.
- Johnson, C.E., Premasuthan, A., Satkoski Trask, J., Kanthaswamy S. (2013) "Species Identification of *Cannabis sativa* Using Real-Time Quantitative PCR (qPCR)" en *J Forensic Sci.*, Número 58(2) pp. 486-490.
- Kanthaswamy, S., Premasuthan, (2012) A. "Quadriplex real-time PCR (qPCR) assay for human-canine-feline species identification and nuclear DNA quantification" en *Forensic Sci Int Genet.*, Número 6(3) pp. e97-8.

- Kanthaswamy, S., Premasuthan, A., Ng, J., Satkoski, J., Goyal, V. (2012) "Quantitative real-time PCR (qPCR) assay for human-dog-cat species identification and nuclear DNA quantification" en *Forensic Sci Int Genet.*, Número 6(2) pp. 290-295.
- Kemp, S.J., Teale, A.J. (1991) "Dinucleotid repeat polymorphism at the bovine locus FSHB" en *Animal Genetics*, Número 22(5) pp. 435.
- Kling, D., Welander, J., Tillmar, A., Skare, O., Egeland, T., Holmlund, G. (2012) "DNA microarray as a tool in establishing genetic relatedness. Current status and future prospects" en *Forensic Sci Int Genet.* Número 6(3) pp. :322-329.
- Kobilinsky, L. (2011) "Forensic Chemistry Handbook" Ed John Wiley & Sons. 528 pgs.
- La Neve, F., Civera, T., Mucci, N., Bottero, M.T. (2008) "Authentication of meat from game and domestic species by SNaP shot minisequencing analysis" en *Meat Science*, Número 80 pp. 216–224.
- Landsteiner, K. (1900) "Zurkenntnis der antifermetativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe" en *Zentralbe Bakteriol*, Número 27 pp. 357-362.
- Mayr, W.R. (1970) "Die genetik des HLA systems" en *Hum Genet* Número 12 pp. 195-199.
- Li, L., Li, C. T., Li, R. Y., Liu, Y., Lin, Y., Que, T. Z., Sun M.Q., Li, Y. (2006) "SNP genotyping by multiplex amplification and microarrays assay for forensic application" en *Forensic Science International*, Número 162(1) pp. 74-79.
- Lindquist, C.D., Evans, J.J., Wictum, E.J. (2011) "Developmental validation of feline, bovine, equine, and cervid quantitative PCR assays" en *J Forensic Sci.*, Número 56 (1) pp. 29-35.
- Litt, M., Luty, J.A. (1989) "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene" en *American Journal of Human Genetics*, Número 44 pp. 397-401.
- Livak, K.J., S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. (1995) "Deetz, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a

quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization” en *PCR Methods Appl.*, Número 4 pp. 357–362.

Mardis, E.R. (2008) "Next-Generation DNA Sequencing Methods" en *Annual Reviews Genomics and Human Genetics*.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., et al. (2005) “Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors” en *Nature*, Número 437 pp. 376–380.

Martinez, D.A., Nelson, M.A. (2010) “The next generation becomes the new generation” en *PLoS Genet.* 6:e1000906.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) “A new method for sequencing DNA” en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Número 74 pp. 560-564.

Meselson, M, Yuan, R. (1968) “DNA restriction enzyme from *E. coli*” en *Nature*, Número 217 pp. 1110-1114.

Metzker, M.L. (2010) “Sequencing technologies - the next generation” en *Nat Rev Genet.*, Número 11(1) pp. 31-46.

Nicklas, J.A., Buel, E. (2003) “Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples” en *J Forensic Sci.*, Número 48(5) pp. 936-944.

Nowrousian, M. (2010) “Next-Generation Sequencing Techniques for Eukaryotic Microorganisms: Sequencing-Based Solutions to Biological Problems” en *Eukaryot Cell*, Número 9(9) pp. 1300–1310.

Oudet, C., Heilig, R., Hanauer, A., Mandel, J.L. (1991) “Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination” en *Am J Hum Genet.*, Número 49(2) pp. 311-319.

Ozsolak, F., Platt, A.R., Jones, D.R., Reifengerger, J G., Sass, L.E., et al. (2009) “Direct RNA sequencing” en *Nature*, Número 461 pp. 814–818.

Park, J.Y., Kim J.H., An Y.R., Kim M.J., Lee W.S., et al. (2010) “A DNA microarray for species identification of cetacean animals in Korean water” en *BioChip Journal*, Número 4(3) pp. 197-203.

- Pinder, S.J., Perry, B.N., Skidmore, C.J., Savva, D. (1991) "Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction" en *Animal Genetics*, Número 22 pp. 11-20.
- Rönn, A.C., Andrés O., López-Giráldez, F., Johnsson-Glans, C., Verschoor, E.J., et al. (2009) "First generation microarray-system for identification of primate species subject to bushmeat trade" en *Endang. Species Res.* Published online June 19, 2009.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, ST. (1989) "Molecular Cloning: A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1626 pp.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) "DNA sequencing with chain – terminating inhibitors" en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Número 74 pp. 5463 – 5468.
- Sobrino, B., Brión, M., Carracedo, A. "SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies" en *Forensic Sci Int.*, Número 154(2-3) pp. 181-94.
- Sokolov, B.P. (1990) "Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA" en *Nucleic Acids Res.*, Número 18 pp. 3671.
- Steffen, P., Eggen, A., Dietz, A., Womack, J.E., Stranzinger, G., Fries, R. (1993) "Isolation and mapping of polymorphic microsattellites in cattle" en *Animal Genetics*, Número 24 pp. 1221-1224.
- Sun, H., Dentine, M.R., Barensse, W., Kirkpatrick, B.W. (1994) "UWCA19 and UWCA20: Polymorphic bovine microsattelite" en *Animal Genetics*, Número 24(2) pp. 142.
- Sun, H., Dentine, M.R., Kirkpatrick, B.W. (1994) "A polymorphic bovine microsattelite" en *Animal Genetics*, Número 24(2) pp. 149.
- Sun, H., Dentine, M.R., Kirkpatrick, B.W. (1993) "A polymorphic microsattelite (UWCA4) detected on bovine chromosome 23" en *Animal Genetics*, Número 24(2) pp. 149.

- Sun, H., Hart, G.L., Kirkpatrick, B.W. (1993) "A polymorphic microsatellite (UWCA1) detected on bovine chromosome 23" en *Animal Genetics*, Número 24(2) pp. 142.
- Sunden, S.L.F., Stone, R.T., Bishop, M.D., Kappes, S.M., Keele, J.W., Beattie, C.W. (1993) "A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM2113" en *Animal Genetics*, Número 24(1) pp. 69.
- Swarbrick, P.A., Dietz, A.B., Womack, J.E., Aston, W.P. (1990) "Ovine and bovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF46 locus" en *Animal Genetics*, Número 23 pp. 182.
- Syvanen, A.C., Aalto-Setälä, K., Harju, L., Kontula, K., Soderlund, H. (1990) "A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E" en *Genomics*, Número 8 pp. 684–692.
- Tautz, D. (1989) "Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers" en *Nucleic Acids Research*, Número 17 (16) pp. 6463-6471.
- Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisse, M., Laudet, V. and Hänni, C. (2008) "Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples" en *Journal of Applied Ecology*, Número 45 pp. 967–975.
- Tyagi, S., Kramer, F.R. (1996) "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" en *Nat. Biotechnol.*, Número 14 pp. 303–308.
- Vaiman, D., Mercier, D., Moazami-Goudarzi, K. "A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism" en *Mammalian Genome*, Número 5 pp. 288-297.
- Wang, Z., Zhang, J., Luo, H., Ye, Y., Yan, J., Hou, Y. (2012) "Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification" en *Cytotherapy*, Número 14(6) pp. 752-66
- Watson, J., Crick, F. (1953) "Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid" en *Nature*, Número 171 pp. 737-738.

Weber, J.L., May, P.E. (1989) "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction" en *American Journal of Human Genetics*, Número 44 pp. 388-396.

Xia, J., Wang, Q., Jia, P., Wang, B., Pao, W., Zhao, Z. (2012) "NGS catalog: A database of next generation sequencing studies in humans" en *Hum Mutat.*, Número 33(6) pp. 2341-2355.

Ziętkiewicz, E., Witt, M., Dąca, P., Żebracka-Gala, J., Goniewicz, M., Jarzab, B., Witt, M. (2012) "Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis" en *J. Appl. Genetics*, Número 53 pp. 41-60.

CAPÍTULO 4

BASES DE DATOS EN GENÉTICA FORENSE

DEFINICIÓN DE BASES DE DATOS EN GENÉTICA FORENSE. TIPOS DE
BASES DE DATOS

*Guillermo Giovambattista, Daniel Estanislao Goszczynski, María Elena
Fernández, Juan Pedro Lirón, Pilar Peral García*

4.1. Introducción

En la práctica de genética forense de rutina, una vez que las muestras llegan al laboratorio, se realizan una serie de pasos sucesivos durante la resolución de casos forenses: extracción de ADN, tipificación de los marcadores genéticos, análisis de los resultados, estimación de los índices forenses y redacción de informes. Es por esta razón que los genetistas forenses, tanto dedicados a genética forense humana como no humana, deben recurrir a las bases de datos genéticos para estimar estadísticamente el valor de los resultados presentados en los informes forenses y, por lo tanto, determinar el peso de la evidencia en un juicio. Además, es frecuente que el perfil de ADN de una evidencia tenga que ser comparado con uno obtenido previamente, motivo por el cual ha surgido la necesidad de implementar las denominadas **bases datos forenses**, definidas como "el conjunto de programas informáticos (*software*) y soportes físicos (*hardware*) donde se almacena de modo ordenado y coherente la información de los perfiles genéticos, así como todo dato asociado a la muestra/individuo, información que luego puede ser recuperada y comparada de modo automático de acuerdo a parámetros previamente establecidos".

En los últimos años, el desarrollo tecnológico en los métodos de genotipificación y de bioinformática ha permitido la generación de una cantidad de información genética que tiene que almacenarse de modo racional y ordenada para su posterior uso. Es por ello que las bases de datos han tenido un gran desarrollo en genética forense humana, y en menor medida en genética forense no humana. Es común que cada laboratorio de genética forense tenga su propia base de datos, producto de la información acumulada correspondiente a las muestras analizadas a lo largo del tiempo, que es utilizada para la estimación de los índices forenses. Sin embargo, estas bases de datos pueden estar sesgadas y no representar el perfil y la estructuración de la/s población/es de donde proceden las evidencias y referencias que tipifica un determinado laboratorio. Por lo tanto, se recomienda la implementación de muestreos especialmente diseñados para construir bases de datos forenses representativas de las zonas de influencia del laboratorio y que los cálculos estadísticos sean realizados a partir de parámetros poblacionales correspondientes a las poblaciones de origen de las muestras analizadas. Estos muestreos deben incluir todos los tipos raciales presentes en una determinada región geográfica. Así por ejemplo, si se desea implementar una base de datos para una determinada especie de animales domésticos, deben muestrearse y tipificarse animales de todas las razas criadas en esa zona. Por otra parte, ante la necesidad de contar con bases de datos representativas y de libre acceso, se han llevado a cabo diferentes iniciativas nacionales e internacionales. A lo largo del capítulo se mencionarán diferentes ejemplos de bases de datos forenses implementadas hasta el momento.

4.2. Clasificación de bases de datos

Se han implementado diferentes tipos de bases de datos genéticos forenses, que pueden agruparse de diferente forma según el criterio utilizado. Como se mencionó en el capítulo 1, la genética forense puede

abordarse a nivel individual, poblacional/racial o de especie, por lo que una primera división de las bases de datos puede basarse en aquellas que son utilizadas para identificación individual y en las empleadas para la determinación de la especie de origen.

Las **bases de datos para identificación genética individual** contienen perfiles de marcadores genéticos, expresados en números y/o letras, asociados al código de identificación de una persona, animal o muestra. El acceso a los datos debe estar perfectamente controlado, y las conclusiones que se pueden obtener de los mismos van a depender de los programas informáticos que sean autorizados por las diferentes legislaciones. El acceso a dichas bases de datos es más o menos restringido, dependiendo de la trascendencia o la propiedad de los datos almacenados, siendo los más protegidos aquéllos que contienen información sobre la "identidad" de las personas (Lorente et al., 2001, 2002a, 2002b; Álvarez-Cubero et al., 2010).

Las **bases de datos genéticos para la determinación del origen especie- específico** de muestras biológicas almacenan secuencias de ADN, especialmente aquellas basadas en la secuenciación de regiones conservadas de ADNmt (por ejemplo, Cyt b, COI). Las principales bases públicas disponibles en la actualidad que pueden ser utilizadas para la determinación del origen especie específico son GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y BOLD (*Barcoding of Life Database*, <http://www.barcodeoflife.org/>). Aunque el GenBank es el repositorio primario de secuencias de ADN, esta base de datos no cuenta con software especializados para el almacenamiento, la organización y el análisis de los datos asociados al origen de las secuencias, y por lo tanto, que certifique la especie de origen de la muestra secuenciada. Por el contrario, en BOLD, la unidad básica de información es el registro del espécimen, el cual es asociado a la información de la secuencia de ADN. El registro del espécimen incluye imágenes y la posición satelital de la localidad donde fue colectado, entre otros datos. En el capítulo 9 se discuten y comparan las características de estas bases de datos en el

contexto de la identificación especie específica. Las bases de datos de secuencia de ADN, por ejemplo las basadas en regiones variables del ADNmt (lazo D; *D-loop*), también pueden ser utilizadas para identificación individual o para la determinación de la raza o población de origen, aunque con un bajo poder estadístico.

Las bases de datos genéticas también pueden clasificarse de acuerdo a la clase de marcadores genéticos que almacenan:

Bases de datos de microsatélites (STRs). Estas bases de datos almacenan los genotipos (perfiles genéticos) de los microsatélites correspondientes a los paneles de identificación genética, y representan la diversidad genética autosómica y la estructura genética de las poblaciones. Los genotipos se ingresan generalmente con números, que representan el número de repeticiones o los pares de bases, o en algunos casos con códigos de letras (por ejemplo, equinos). Esta nomenclatura es estandarizada internacionalmente. En el caso de los animales domésticos, el panel de microsatélites y la nomenclatura es recomendada por la ISAG (<http://www.isag.us/>). Un ejemplo de bases de datos basadas en STRs es la Unidad CODIS. Esta base maneja los sistemas CODIS (*Combined DNA Index System*) y NDIS (*National DNA Index System*) y desarrolla y provee soporte técnico al programa CODIS (<http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis>). En marzo de 2014 esta base de datos contenía más de 10 millones de perfiles de ADN basados en el panel CODIS de STRs. Actualmente, la eficiencia del programa es medida por la cantidad de crímenes que ha ayudado a resolver.

Base de datos de linajes maternos y paternos. Este tipo de base de datos genéticos almacena información de haplotipos mitocondriales o del cromosoma Y, ya sea producto del análisis de microsatélites, SNPs, o ambos. Dado que los marcadores genéticos con herencia materna o paterna no tienen una distribución geográfica al azar, los perfiles de las evidencias tienen más probabilidad de compartir características con los individuos de la misma región (Roewer et al., 2007). Es por esta razón

que aunque tienen poco poder estadístico para la identificación de individuos, son de gran utilidad para determinar su origen racial. Las bases de datos de ADNmt son de gran utilidad en genética forense, ya que generalmente esta clase de marcadores pueden ser obtenidos a partir de rastros o en muestras altamente degradadas.

Un ejemplo de bases de datos de linajes es YHRD (*Y Chromosome Haplotype Reference Database*). Se trata de la mayor base de datos de haplotipos del cromosoma Y humano; está ubicada en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Berlín, Alemania, www.yhrd.org) y contiene más de 115.000 haplotipos pertenecientes a 850 poblaciones humanas (Willuweit y Roewer, 2007). YHRD es de gran utilidad para inferir la población de origen de una muestra (linaje paterno). Además, los haplotipos del cromosoma Y basados en STRs son de particular utilidad para tipificar ADN de machos purificados a partir de muestras forenses que presentan mezcla.

EMPOP (www.empop.org) es la mayor base de datos de ADNmt y es mantenida por el Instituto de Medicina Legal de Innsbruck, Austria. El repositorio posee en la actualidad más de 34.000 secuencias de la región hipervariable de la región control del ADNmt, gracias a la colaboración de más de 100 instituciones de 63 países (Parson y Dür, 2007). Esto pone en evidencia la importancia de las colaboraciones internacionales para la implementación de estas bases de datos.

Base de datos de secuencias de ADN. Mientras que las dos primeras permiten la identificación de individuos y del origen racial, estas bases de datos genéticas son utilizadas principalmente para la determinación de la especie de origen de una muestra. Almacenan secuencias de ADN, siendo las regiones conservadas del ADNmt las más utilizadas. Como se mencionó anteriormente, los dos principales repositorios que incluyen secuencias que pueden ser utilizadas para identificación especie-específica son GenBank y BOLD. Por otra parte, también existen bases de datos específicas, como por ejemplo, la perteneciente a la Unidad de ADN Mitocondrial (mtDNAU);

<http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/mtdna>) del FBI (*Federal Bureau of Investigation*), que analiza y almacena secuencias de ADNmt humanas para resolver diferentes tipos de crímenes.

De acuerdo a la procedencia de las muestras, las bases de datos pueden dividirse en:

Bases de datos poblacionales. Estas bases de datos almacenan perfiles genéticos (genotipos) de individuos representativos de la/s población/es de pertenencia de los individuos involucrados en un delito. Permiten obtener las frecuencias génicas y otros parámetros poblacionales necesarios para el cálculo del poder de exclusión y los índices forenses (ver capítulos 5 y 6).

Ejemplos de bases de datos poblacionales en animales domésticos son los trabajos realizados por Halverson y Basten (2005), Himmelberger y colaboradores (2008) y Kanthaswamy y colaboradores (2009). Estos estudios incluyeron el análisis de 18 microsatélites de la región control del ADNmt en las poblaciones de las razas más populares de EE.UU, según los registros de pedigrís de la Asociación Canina Norteamericana (AKC, por sus siglas en inglés, *American Kennel Club* <http://www.akc.org/>), así como de perros mestizos distribuidos a lo largo de EE.UU. La base de datos resultante es de acceso público y contiene información sobre los loci, las frecuencias génicas, la distribución de la variación genética entre las poblaciones analizadas, las estimaciones de la probabilidad de coincidencia entre muestras y los coeficientes de consanguinidad (*STR DNA Internet DataBase*, <http://www.cstl.nist.gov/strbase/>). Entre las razas incluidas se encuentran tanto las que se usan comúnmente como mascotas como aquéllas que han sido causales de agresiones a humanos y animales. Es por ello que estas bases de datos poblacionales pueden ser utilizadas para resolver casos de robo de mascotas y ataques a humanos o animales.

Los gatos son uno de los animales domésticos más comunes en todo el mundo, razón por la que es usual encontrar pelos de esta especie en la escena del crimen, los que pueden ser usados para relacionar a la

mascota con la víctima y/o el sospechoso. Con el fin de establecer una base de datos para usos forenses, Grahn et al. (2011) analizaron el lazo D mitocondrial de 25 poblaciones correspondientes a 26 razas de gatos distribuidas en todo el mundo.

Bases de datos de inteligencia. Esta clase de bases de datos almacena la información genética de muestras de individuos conocidos, generalmente acusados o culpables de algún delito, así como de donantes muestreados al azar en la población. Su aplicación permite comparar los genotipos de las evidencias recolectadas en el lugar del hecho con los perfiles almacenados en la base de datos y de esta forma identificar al autor de un ilícito. El primer uso de este tipo de bases de datos para resolver un crimen ocurrió en el Reino Unido en el año 1995. La frase "*cold hit*" se refiere a la coincidencia (*match*) entre el perfil de ADN de una evidencia y el de una muestra almacenada en la base de datos. Los "cold hit" son de gran utilidad para la identificación del sospechoso durante una investigación. Dependiendo del contenido de estas bases de datos, podemos diferenciar:

Bases de datos forenses criminales. Almacenan perfiles genéticos procedentes de personas que han sido procesadas o condenadas, así como de indicios biológicos encontrados en la escena del crimen. En algunos casos pueden considerarse perfiles genéticos de víctimas conocidas, con el objeto de facilitar la resolución de delitos. Su característica principal es que algunas de las muestras y datos considerados se obtienen sin el consentimiento de las personas implicadas.

Bases de datos forenses civiles. Su único fin es la identificación de personas desaparecidas, lo cual se hace comparando el ADN de los individuos no identificadas con el de los familiares. Por sus características humanitarias, se requiere que los familiares colaboren de modo voluntario luego de firmar un consentimiento informado siguiendo las consideraciones del protocolo de Helsinki (<http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>), hecho que las

diferencia de las bases de datos criminales. Así por ejemplo, podemos mencionar el programa Fénix (<http://www.guardiacivil.org/prensa/actividades/fenix/index.jsp>) y la iniciativa DNA-PROKIDS (<http://www.dna-prokids.org/>).

El Programa Fénix fue implementado para la identificación mediante ADN de cadáveres y restos humanos procedentes de guerras, problemas socio-políticos y desastres en masa. El programa contiene dos bases de datos independientes. Una de ellas es la *Base de Datos de Referencia* que contiene información de microsátélites de ADN nuclear y del cromosoma Y, así como secuencias de ADNmt de parientes. La otra base de datos se denomina *Base de Datos Dubitada* y contiene todos los perfiles genéticos de los restos encontrados que no han podido ser identificados por métodos clásicos (identificación de huellas dactilares, parámetros antropológicos, odontología, rayos X). La comparación los perfiles genéticos depositados en ambas bases ha permitido la identificación de cientos de restos (Lorente et al., 2001; <http://www.guardiacivil.org/prensa/actividades/FÉNIX/presentacion.jsp>).

Estrategias similares se han implantado en todo el mundo: Argentina (Banco Nacional de Datos; <http://www.mincyt.gov.ar/ministerio/banco-nacional-de-datos-geneticos-bndg-23>), Brasil (*Missing person Database-gen*; da Silva et al., 2009), la antigua Yugoslavia (ICMP, *International Commission of Missing Persons*), Colombia (FÉNIX-Colombia", Laboratorio de Genética del Centro Técnico de Investigación, Fiscalía General de la Nación), Chile (el Servicio Médico Legal) y EE.UU (*Texas Missing Persons DNA Database*, UNT Health Science Center).

La Iniciativa DNA-PROKIDS es un proyecto internacional diseñado para luchar contra el tráfico de seres humanos a través de la identificación genética de las víctimas y sus familiares, especialmente en niños (<http://www.dna-prokids.org/>). Este proyecto se inició en España y se ha ampliado a China, India, Indonesia, Filipinas, Nepal, Sri Lanka, Tailandia, Brasil, Guatemala y México. DNA-PROKIDS; el mismo emplea los marcadores genéticos de rutina, como los STR incluidos en el

CODIS, ADNmt y STR del cromosoma Y. Actualmente se están desarrollando paneles de SNPs que permitirán determinar características fenotípicas de los individuos, así como su procedencia geográfica y étnica. Sobre la base de este tipo de información genética se podrán crear bases de datos que permitirán la identificación de menores víctimas de tráfico humano y la reunificación de éstos con sus familias.

Las bases de datos de genética forense están mucho más desarrolladas en humanos que animales. Sin embargo, en esta última área de aplicación existen bases de datos equivalentes a las antes mencionadas:

Bases de datos de los servicios de filiación. Para la inscripción de reproductores en los libros genealógicos de las principales especies de animales de producción y de compañía, tales como bovinos, equinos, ovinos y perros, se requiere certificar la paternidad mediante análisis de ADN. Por ello, los laboratorios que realizan rutinariamente estos análisis poseen extensas bases de datos que permiten verificar la paternidad declarada o comparar un perfil genético con los previamente almacenados en la base de datos para resolver una filiación. Originalmente se almacenaban datos de grupos sanguíneos y de polimorfismos bioquímicos, y actualmente se incluyen los microsatélites. Estas bases también podrían ser empleadas como bases de datos poblacionales o de inteligencia. En Argentina, la mayor base de datos de este tipo, con varios miles de perfiles genéticos, se encuentra en el laboratorio de Genética Aplicada de la Sociedad Rural Argentina (SRA, <http://www.sra.org.ar/laboratorio/>), aunque no es de acceso libre. En el caso particular de los perros, la base de datos de esta especie es mantenida por el Laboratorio de Genética de Animales Domésticos del IGEVET (UNLP-CONICET LA PLATA), FCV- UNLP (http://igevet.laplata-conicet.gov.ar/index.php?title=P%C3%A1gina_principal).

Bases de datos para resolución de abigeato. El robo de ganado o abigeato, así como el robo de mascotas, es un delito común en muchos

países. La creación de bases de datos poblacionales y de inteligencia puede ser de utilidad para resolver este tipo de delitos. En el año 2001, la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y la provincia de Buenos Aires pusieron en marcha el Programa Provincial de Identificación Genética para la Prevención y Resolución de Casos de Abigeato en Ganado Mayor (Bovinos y Equinos). Este programa, que posteriormente fue extendido a otras regiones del país, contempló tanto la resolución de estos casos mediante análisis de ADN, como la implementación de bases de datos poblacionales que permitan la estimación de los índices forenses. Por otra parte, la custodia de muestras permite contar con muestras de referencia.

Finalmente, cabe mencionar que en el área de salud también se han implementado bases de datos que incluyen perfiles genéticos asociados a registros médicos y ambientales. Ejemplos de estos repositorios, denominados biobancos, son el Biobank del Reino Unido (<https://www.ukbiobank.ac.uk/>) y el de EE.UU (Henderson et al., 2013; <http://usbiobankstudy.web.unc.edu/>).

4.3. Consideraciones finales

Las bases de datos forenses han crecido ininterrumpidamente durante los últimos años, especialmente en la especie humana (Levitt, 2007). Así por ejemplo, países como China poseen aproximadamente 16 millones de perfiles genéticos humanos incorporados en sus bases de datos, Estados Unidos unos 10 millones de perfiles y el Reino Unido aproximadamente 6 millones de perfiles, siendo estos países los que mantienen las mayores bases de datos de perfiles de ADN humanos. Estos valores representan un alto porcentaje de la población: el 10% de la población del Reino Unido, el 0,9% de Alemania y el 0,8% de los Países Bajos están tipificados (Levitt, 2007).

Pero, ¿cuáles son los beneficios y riesgos de expandir las bases de datos genéticos? Desde el punto de vista técnico, el incremento de las bases de datos aumenta significativamente la probabilidad de que ocurran coincidencias (*match*) entre perfiles de ADN correspondientes a muestras de evidencias y de individuos inocentes (voluntarios) almacenados en las bases de datos (Gill et al., 2006). Estos eventos ya se han observado en repetidas ocasiones, tanto en bases de datos humanas como de animales domésticos, y ha llevado a recomendar un aumento en el número de los marcadores genéticos analizados y a utilizar métodos de cálculos más conservadores.

Por otra parte, el desarrollo de las bases de datos forenses ha hecho necesario discutir los criterios de inclusión y retención de muestras y perfiles de ADN, la eficiencia para la resolución de casos forenses, y el efecto sobre la privacidad de las personas. En las bases de datos forenses no humanas, este último punto de discusión (central para las bases de datos humanas) es reemplazado por la cuestión de la propiedad de las muestras y, por lo tanto, de los perfiles de ADN.

Los beneficios de las base de datos son evidentes, ya que en el pasado numerosos crímenes han podido ser resueltos mediante la comparación de los perfiles de ADN obtenidos de las evidencias y de aquellos depositados en los repositorios. Sin embargo, los beneficios de los análisis de ADN en genética forense tendrán necesariamente un costo social y ético, y será necesario maximizar los esfuerzo para minimizarlo (Lewitt, 2007).

4.4. Referencias Bibliográficas

Álvarez-Cubero M.J., L.J. Mtnez.-Gonzalez; M. Saiz, J.C. Álvarez, J.A. Lorente. 2010. Nuevas aplicaciones en identificación genética New applications in genetic identification Cuadernos de Medicina Forense Cuad. med. forense 16(1-2).

da Silva LAF, Vilaça W, Azevedo D, Majella G, Silva IF, Silva BF. Missing and unidentified persons database. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series* 2009; 2:255-7.

Gill P., Fereday L., Morling N., Schneider PM. (2006) The evolution of DNA databases recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* 156, 242-244.

Grahn, R.A., Kurushima, J.D. , Billings, N.C., Grahn, J.C., Halverson, J.L., Hammera, E., Ho, C.K., Kun, T.J., Levy, J.K., Lipinski, M.J., Mwenda, J.M., Ozpinar, H., Schuster, R.K., Shoorijeh, S.J., Tarditi, C.R., Waly, N.E., Wictum, E.J., Lyons, L.A., (2011) “Feline non-repetitive mitochondrial DNA control region database for forensic evidence” en *Forensic Sci Int Genet.* Número 5(1), pp 33-42.

Halverson, J., Basten, C.A., (2005) “PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs” en *Journal of Forensic Science*, Número 50, pp. 1–12.

Henderson GE, Cadigan RJ, Edwards TP, Conlon I, Nelson AG, Evans JP, Davis AM, Zimmer C, Weiner BJ. Characterizing biobank organizations in the U.S.: results from a national survey, *Genome Medicine* 2013, 5:3 doi:10.1186/gm407.

Himmelberger AL, Spear TF, Satkoski JA, George DA, Garnica WT, Malladi VS, Smith DG, Webb KM, Allard MW, Kanthaswamy S, Forensic Utility of the Mitochondrial Hypervariable Region 1 of Domestic Dogs, in Conjunction with Breed and Geographic Information. *J Forensic Sci* 2008, 53(1), 81-89.

Kanthaswamy S, Bradley KT, Mattila AM, Johnston E, Dayton M, Kinaga J, Erickson BJ-A, Halverson J, Fantin D, DeNise S, Kou A, Kanthaswamy, Malladi V, Satkoski J, Budowle B, Smith DG, Koskinen MT, Canine population data generated from a multiplex STR kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci*, 2009 54, 829-840.

Levitt M: Forensic databases: benefits and ethical and social costs. *Br Med Bull* 2007, 83:235–248.

Lorente JA, Alvarez JC, Entrala C, Martinez-Espin E, Fernandez-Rosado F, Lorente M, et al. Bases de datos de ADN: Su uso en la investigación criminal y en la identificación civil. Anotaciones prácticas para su desarrollo. *Forénsica* 2002; 1:31-44.

Lorente JA, Entrala C, Alvarez JC, Arce B, Heinrichs B, Lorente M, et al. Identification of missing persons: The Spanish "Phoenix" program. *Croat Med J* 2001; 42:267-70.

Lorente JA, Entrala C, Alvarez JC, Lorente M, Arce B, Heinrich B, et al. Social benefits of non-criminal genetic databases: Missing persons and human remains identification. *Int J Legal Med* 2002; 116:187-90.

Parson W, Dür A: EMPOP - a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet* 2007, 1:88–92.

Roewer L, Croucher PJ, Willuweit S, Lu TT, Kayser M, Lessig R, de Knijff P, Jobling MA, Tyler-Smith C, Krawczak M: Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. *Hum Genet* 2005, 116:279–291.

Willuweit S, Roewer L, International Forensic Y Chromosome User Group: Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Sci Int Genet* 2007, 1:83–87.34.

CAPÍTULO 5

BASES ESTADÍSTICAS DE LA GENÉTICA FORENSE

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA EN LAS PRUEBAS DE ADN EN LA CIENCIA FORENSE ANIMAL. IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL Y FILIACIONES

Juan Pedro Lirón, María Elena Fernández, Guillermo Giovambattista

5.1. Introducción

La utilización de la tipificación a nivel ADN en las ciencias forenses se ha convertido en una herramienta extremadamente útil para diferenciar un individuo de otro o establecer relaciones de parentesco, y se fundamenta en principios científicos y técnicos que son aceptados universalmente. Estas nuevas técnicas moleculares permiten el estudio de la diversidad biológica en el nivel más básico: el propio material genético, el ADN. Los principios básicos y las metodologías convencionales de la genética de poblaciones y la estadística pueden ser utilizados para interpretar los resultados de análisis de ADN en casos forenses. Debido a la aparición relativamente nueva de las técnicas de ADN, los tribunales han sometido sus fundamentos y métodos de aplicación a un minucioso estudio y control de calidad. En los comienzos de la utilización de los perfiles de ADN en la corte, se consideraba que la interpretación de los resultados poseía un cierto y aparente grado de complejidad, lo que impedía un pleno uso de sus invaluables cualidades. Sin embargo, con el paso de los años, las

metodologías experimentales y estadísticas han evolucionado notablemente, constituyendo hoy en día uno de los campos más sólidos y reconocidos en la corte como elemento de prueba.

El objetivo principal de este capítulo consiste en introducir las bases estadísticas de las pruebas de ADN y explicar cómo sus resultados pueden utilizarse para la determinación de relaciones de parentesco y la resolución de casos forenses en la ciencia animal.

Desde la introducción de las técnicas de ADN en las ciencias forenses en la década de los 80, ha habido un gran avance en las metodologías y herramientas de estudio de la variabilidad genética a nivel molecular, incrementado dramáticamente la sensibilidad y la discriminación de las técnicas de análisis. Actualmente, las técnicas moleculares más utilizadas en las ciencias forenses se basan en la aplicación de la técnica de PCR y la utilización de perfiles genéticos basados en marcadores moleculares nucleares como los microsatélites (STRs) y más recientemente en los SNPs y los marcadores uniparentales (ADNmt y cromosoma Y). Si bien los principios matemáticos y de genética de poblaciones pueden ser aplicados con ciertas modificaciones a marcadores genéticos que poseen distintos tipos de herencia y ubicación cromosómica, los modelos estadísticos desarrollados en este capítulo se aplican a loci de herencia codominante (siempre podemos inferir los dos alelos que posee un individuo para un genotipo determinado) y ubicados en cromosomas no sexuales o autosómicos (ver *Notación*).

Notación

Supongamos que un locus o gen A puede tomar varias formas alternativas o alelos, A_i . Un individuo posee dos alelos, cada uno heredado de un progenitor. Cuando los dos alelos de un individuo son iguales, por ejemplo A_iA_i decimos que el genotipo del individuo es homocigota. En cambio, si el individuo recibió diferentes alelos de sus progenitores para este locus, por ejemplo A_iA_j , decimos que es de genotipo heterocigota.

En un determinado cruzamiento, un individuo transmite a su descendencia uno de los dos alelos que posee para cada gen. La elección del locus particular que transmite es considerada aleatoria en el sentido que cada alelo posee la misma probabilidad de ser heredado. Este modelo de herencia, propuesto por Mendel en 1865, es la base genética de las pruebas de paternidad. Si una madre posee los alelos A_1A_2 y su cría posee el genotipo A_2A_3 , resulta claro que el alelo A_2 ha sido heredado de su madre y el A_3 de su padre. Entonces, todos los machos que no posean el alelo A_3 , por ejemplo padres con los genotipos A_1A_2 , A_2A_2 o A_1A_4 , pueden ser excluidos como posibles padres de la cría.

5.2. Interpretación de la evidencia

5.2.1 identificación individual: casos forenses

Los marcadores genéticos se han aplicado a la identificación individual desde el descubrimiento de los grupos sanguíneos, jugando un rol fundamental en las disputas de paternidad. Simultáneamente a la aparición de estas técnicas bioquímicas, hubo una evolución concomitante de la estadística aplicada a las ciencias genéticas forenses. A final de los años 80, los perfiles de ADN comenzaron a utilizarse para excluir una persona específica como origen de cierta evidencia biológica encontrada en la escena del delito. En estos casos,

es necesario establecer la probabilidad de hallar el perfil genético del acusado en caso de no ser éste el aportante de la evidencia. Con el paso del tiempo se ha incrementado el número de marcadores genéticos utilizados, disminuyendo notablemente la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la población coincidan con un mismo perfil genético y por ende justificando la hipótesis que el sospechoso es el verdadero aportante de la evidencia genética. Un ejemplo común de la aplicación de las ciencias forenses es la resolución de casos de robo de ganado, o abigeato. En estos casos, los perfiles de ADN se obtienen a partir de muestras biológicas halladas en la escena del robo o evidencia (pelos, sangre, restos de carne y otros tejidos) y de esta forma pueden ser comparados con los perfiles de ADN de muestras biológicas secuestradas a los sospechosos del delito o referencia (carne, manchas de sangre en la ropa o cuchillos). La comparación de los perfiles genéticos de la evidencia y la referencia puede arrojar tres resultados posibles:

1. Si los perfiles de ADN de la evidencia coinciden con los de la referencia en todos los loci estudiados, este hallazgo se interpreta como una "*inclusión*" o una "imposibilidad de excluir".
2. Si los dos perfiles no son consistentes en alguno de los loci, el hallazgo se puede interpretar como una no coincidencia o "*exclusión*".
3. Si no hay datos suficientes para apoyar una conclusión, el hallazgo se interpreta como "*no concluyente*".

Si ha ocurrido una coincidencia en el perfil genético de la muestra de evidencia y referencia obteniéndose una *inclusión*, este resultado puede tener dos interpretaciones posibles:

1. Los perfiles de ADN de la evidencia coinciden con los de la referencia, dado que las dos muestras *proviene del mismo individuo* (por ejemplo, los restos de tejidos secuestrados en el lugar del robo pertenecen al mismo animal que las muestras de carne secuestradas

al sospechado de cometer el ilícito). Esta es la hipótesis de la fiscalía o acusador.

2. Las muestras de la evidencia *no provienen del mismo individuo* al cual pertenecen las muestras de la referencia y por ende los perfiles genéticos de la evidencia coinciden con otro individuo de la población. Esta es la hipótesis de la defensa.

Desde sus comienzos, la identificación genética se ha basado en principios científicos, evitando que en las conclusiones hubiera opiniones de expertos basadas en la experiencia y no en la objetividad. Uno de las principales características de la presentación de la evidencia genética en la corte es que los informes no son de tipo determinista, es decir que eliminan las afirmaciones categóricas de identificación o exclusión que existen en otras disciplinas. En su lugar, los resultados de las pericias se presentan en forma de razones probabilísticas y se expresan como relaciones de verosimilitud dentro de un contexto matemático de tipo bayesiano.

Índice forense “likelihood ratio” (LR). El índice forense es una forma de cuantificar el peso de la evidencia genética. La verosimilitud LR de una hipótesis H dada la evidencia E puede expresarse como $LR(H \setminus E)$. La verosimilitud de una hipótesis (H_1) se evalúa siempre en forma relativa a otra hipótesis (H_2). Esta comparación se denomina razón de verosimilitud:

$$LR_{H_1, H_2 \setminus E} = \frac{\Pr(E \setminus H_1)}{\Pr(E \setminus H_2)} \quad (1)$$

donde $\Pr(E \setminus H_1)$ es la probabilidad condicional de la evidencia E bajo la hipótesis H_1 y $\Pr(E \setminus H_2)$ la probabilidad condicional de la evidencia E bajo la hipótesis H_2 .

En los casos de identificación individual se compara el patrón genético de los restos orgánicos de los animales faenados ilegalmente

(referencia) con las muestras biológicas secuestradas a los imputados (evidencia). Por lo tanto, en el marco de las probabilidades condicionales, el término E corresponde a los genotipos de las dos muestras biológicas analizadas (evidencia y referencia). En el caso que estos dos perfiles genéticos sean iguales, lo que corresponde a una inclusión, las hipótesis alternativas a contrastar son las siguientes:

H_f, hipótesis de la fiscalía o del acusador: la muestra secuestrada a los imputados (evidencia) perteneció al mismo individuo que los restos orgánicos correspondientes a los animales faenados ilegalmente (referencia).

H_d, hipótesis de la defensa: la muestra secuestrada a los imputados no se corresponde con el animal faenado y por ende corresponde a otro animal de la población.

A partir de aquí, introduciremos alguna terminología adicional y denotaremos al genotipo de la evidencia como **G_e** y al genotipo de la muestra de referencia como **G_r**. Nótese que en el caso que estamos tratando $G_e = G_r$. Además, designaremos como **I** a cualquier otro tipo de información o evidencia no genética que eventualmente posea la corte en relación a las hipótesis de la defensa y la acusación. Previo a la tipificación de ADN, la probabilidad de H_f estaba condicionada por I: $\Pr(H_f/I)$. Luego de la evidencia genética, la probabilidad H_f pasa a estar condicionada además por G_e y G_r: $\Pr(H_f/G_e, G_r, I)$. De la misma manera, aplicamos el mismo razonamiento con H_d: $\Pr(H_d/G_e, G_r, I)$. Claramente, H_d y H_f son sucesos exhaustivos y mutuamente excluyentes. Esta propiedad establece uno de los principios fundamentales de la interpretación de la evidencia, que expresa que para poder establecer la certeza de una proposición es necesario considerar al menos una proposición alternativa. En principio podemos considerar sólo la información de origen no genético y expresar la relación entre las dos hipótesis como una razón de probabilidades (*odds* en inglés) *a priori* en favor de la fiscalía:

$$\frac{\text{Pr } H_f / I}{\text{Pr } H_d / I} \quad (2)$$

La forma de incorporar la razón de probabilidades *a priori* a favor de la fiscalía es ordenando la ecuación con la hipótesis H_f en el numerador. De este modo expresamos cuántas veces es más probable que el acusado sea culpable que inocente. Invirtiendo la fórmula (LR en favor de la defensa) expresaríamos cuánto más probable es que el acusado sea inocente que culpable.

A continuación, incorporamos la evidencia genética y lo expresamos como una razón de probabilidades *a posteriori* en favor de la fiscalía:

$$\frac{\text{Pr } H_f / G_r, G_e, I}{\text{Pr } H_d / G_r, G_e, I} \quad (3)$$

Aplicando el teorema de Bayes a la expresión anterior y reemplazando (G_e, G_r) por E , llegamos a la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Pr } H_f / E, I}{\text{Pr } H_d / E, I} = \frac{\text{Pr } E / H_f, I}{\text{Pr } E / H_d, I} * \frac{\text{Pr } H_f / I}{\text{Pr } H_d / I} \quad (4)$$

$$\text{razón a posteriori} = \text{LR} * \text{razón a priori}$$

Esta ecuación es de central importancia en la interpretación de genética forense ya que permite distinguir el rol de la corte – establecido en la parte izquierda de la igualdad – del rol del científico forense, que corresponde al primer término del lado derecho de la igualdad. Mientras que la corte evalúa la probabilidad de culpabilidad o inocencia del acusado en relación con las evidencias, el científico aborda otro tipo de problemática diferente: “cuál es la probabilidad de la evidencia si la hipótesis de la fiscalía fuese cierta” y “cuál es la probabilidad de la evidencia si la hipótesis de la defensa fuese cierta”.

La ecuación 4 muestra que la probabilidad *a posteriori* viene determinada por la razón *a priori* multiplicada por un cociente de dos probabilidades o razón de verosimilitud LR (*likelihood ratio*):

$$LR = \frac{\Pr G_e, G_r / H_f, I}{\Pr G_e, G_r / H_d, I} \quad (5)$$

expandiendo la ecuación anterior:

$$LR = \frac{\Pr G_e / G_r, H_f, I}{\Pr G_e / G_r, H_d, I} \cdot \frac{\Pr G_r / H_f, I}{\Pr G_r / H_d, I} \quad (6)$$

Los términos $\Pr G_r / H_f, I$ y $\Pr G_r / H_d, I$ denotan la probabilidad de la muestra de referencia secuestrada al sospechoso de hurto dado que pertenezca o no, respectivamente, al mismo animal que la evidencia tomada en el lugar del robo. Es importante observar que estos términos son equivalentes y se simplifican en la ecuación porque la probabilidad del genotipo G_r no varía entre las dos hipótesis H_d y H_f , sea la muestra de referencia y evidencia originadas del mismo animal o no.

El índice forense (Evet y Weir, 1998) se estima entonces como:

$$LR = \frac{\Pr G_e \setminus G_r, H_f, I}{\Pr G_e \setminus G_r, H_d, I} \quad (7)$$

si se considera primero el numerador, en donde las muestras de referencia y evidencia pertenecen al mismo individuo y no existen errores en la tipificación de los marcadores genéticos. La probabilidad según la hipótesis H_f de que G_e sea igual a G_r , dado que pertenecen al mismo individuo, es igual a 1. Recordemos que estamos considerando un caso de inclusión genética. Entonces, el índice LR se transforma en:

$$LR = \frac{1}{Pr G_e | G_r, H_d} \quad (8)$$

Nos queda por último calcular la probabilidad del denominador. Para asignar dicho valor, se debe responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la probabilidad de observar el genotipo de la evidencia G_e igual al de la referencia G_r , si la muestra de la evidencia pertenece a otro individuo diferente del que aportó la muestra de referencia? Si se considera a “otro individuo” como un animal tomado al azar de la población de origen de la muestra hallada en el lugar del hecho, la probabilidad de que la evidencia y la referencia posean idéntico genotipo depende de las frecuencias génicas de dicha población (ver Anexos 5.5.1 y 5.5.2). De esta forma, el índice LR se calcula como:

$$LR = \frac{1}{P} \quad (9)$$

donde P es la frecuencia esperada del genotipo en la población y se calcula a partir de bases de datos de individuos tipificados para los mismos marcadores moleculares que los utilizados para construir los perfiles genéticos del caso. Supongamos que podemos calcular la frecuencia P del genotipo G en la población de referencia, a la cual pertenece la muestra secuestrada al imputado, considerando que no pertenece al mismo animal que se posee como evidencia $Pr G_r | G_e, H_d$. Asignamos de esta manera la probabilidad P al denominador de la ecuación 9. Por ejemplo, si la frecuencia de P en la población es 0,0001, el LR se calcula como $LR = 1/0,0001 = 100.000$. Esta evidencia puede ser presentada de la siguiente forma: “La evidencia es diez mil veces más probable si la muestra de referencia perteneció al mismo individuo faenado en el lugar del hurto que a algún otro animal desconocido”.

$$LR = \frac{\Pr G_c / G_m, G_p, H_p}{\Pr G_c / G_m, G_p, H_d} * \frac{\Pr G_m, G_p / H_p}{\Pr G_m, G_p / H_d} \quad (11)$$

Tanto H_p como H_d no cambian el valor de G_m y G_p del segundo término, por lo tanto este cociente es igual a 1. Entonces:

$$LR = \frac{\Pr G_c / G_m, G_p, H_p}{\Pr G_c / G_m, G_p, H_d} \quad (12)$$

El cálculo del índice de paternidad proviene de evaluar el numerador y denominador de esta ecuación para las diferentes combinaciones de alelos que puedan tener los genotipos del trío: madre, hijo y padre alegado. El numerador expresa la probabilidad del genotipo de la cría dado los genotipos de la madre y padre alegado, y puede ser evaluado mediante un cuadrado de Punnett. Como poseemos el genotipo de la madre, es posible determinar el alelo materno A_m y el paterno A_p que posee la cría. Incorporando esto en el denominador de la ecuación anterior, tenemos:

$$\frac{\Pr G_c / G_m, G_p, H_d}{\Pr A_m, A_p / G_m, G_p, H_d} = \frac{\Pr A_m / G_m * \Pr A_p / G_m, G_p, H_d}{\Pr A_m / G_m, G_p, H_d * \Pr A_p / G_m, G_p, H_d} \quad (13)$$

Asumiendo que $\Pr(A_m/G_m, G_p, H_p) = \Pr(A_m/G_m)$, el denominador de LR se convierte en:

$$\Pr A_m / G_m * \Pr A_p / G_m, G_p, H_d \quad (14)$$

Es fácil notar que la probabilidad $\Pr(A_m/G_m)$ de que la cría reciba un alelo materno es 1 o $\frac{1}{2}$ si la madre es homocigota o heterocigota, respectivamente. Generalmente esta probabilidad se denomina factor mendeliano materno, M_M . La segunda parte del denominador considera

la probabilidad del alelo paterno A_P considerando que no es heredado del padre alegado, sino de otro padre. Este término de la ecuación se denomina factor mendeliano paterno, M_P . Para calcularlo, necesitamos conocer las frecuencias génicas de este alelo en la población de los posibles padres de la cría. A continuación ejemplificaremos el cálculo del índice de paternidad para algunas combinaciones de genotipos de los padres y la cría:

Ejemplo 1.

Consideremos los siguientes genotipos del trío: $G_M=cd$, $G_P=ab$ y $G_C=ac$. Para el cálculo del numerador la ecuación 12, $Pr(G_C/G_M, G_P, H_P)$, tenemos que los cuatro posibles genotipos de la cría vienen del siguiente cuadro.

		Alelos del padre	
		a	b
Alelos de la madre	c	ac	bc
	d	ad	bd

Los cuatro genotipos posibles de la cría son equiprobables y por lo tanto la probabilidad de que la cría tenga el genotipo ac es de $\frac{1}{4}$. Ahora resta calcular el denominador. Como la madre es heterocigota, la primera parte del denominador o factor mendeliano materno, $Pr(A_m/G_m)$, es $\frac{1}{2}$. El alelo paterno es $A_p = a$, entonces $Pr(A_p/G_M, G_P, H_d)$ es la frecuencia del alelo a en la población, que denominaremos p_a . De esta forma, obtenemos el índice de paternidad para este ejemplo:

$$IP = \frac{\frac{1}{4}}{\frac{1}{2} p_a} = \frac{1}{2 p_a}$$

Ejemplo 2.

Consideremos ahora los siguientes genotipos del trío: $G_M=cc$, $G_P=ab$ y $G_C=ac$. Para el cálculo del numerador $Pr(G_C/G_M, G_P, H_P)$, tenemos dos posibles genotipos de la cría que provienen del siguiente cuadro.

		Alelos del padre	
		a	B
Alelos de la madre	c	ac	Bc
	c	ac	Bc

Los 2 genotipos posibles de la cría son equiprobables y por lo tanto la probabilidad del genotipo ac es $\frac{1}{2}$. Como la madre es homocigota, el factor mendeliano materno, $\Pr(A_m/G_m)$, es 1. El alelo paterno A_p es a, entonces $\Pr(A_p/G_M, G_P, H_d)$ es la frecuencia del alelo a en la población, p_a . El índice de paternidad para este ejemplo viene expresado entonces como:

$$IP = \frac{\frac{1}{2}}{1 p_a} = \frac{1}{2 p_a}$$

Ejemplo 3:

Consideremos ahora los siguientes genotipos del trío: $G_M=ab$, $G_P=bc$ y $G_C=ab$. Para el cálculo del numerador, los cuatro genotipos posibles de la cría se obtienen a partir del siguiente cuadro.

		Genes del padre		
		b	C	
Genes de la madre	a	ab	Ac	
	b	bb	Bc	

Los cuatro genotipos posibles de la cría son equiprobables y por lo tanto la probabilidad de tener el genotipo ac es de $\frac{1}{4}$. Como la madre es ab y el hijo ab, puede haberle pasado cualquiera de sus dos alelos con probabilidad de $\frac{1}{2}$. Dependiendo de qué alelo pasó la madre, el alelo paterno A_p podrá ser a con probabilidad p_a o b con probabilidad p_b . De este modo, el denominador quedará como $(\frac{1}{2} p_a + \frac{1}{2} p_b)$. Finalmente, el índice de paternidad para este ejemplo equivale a:

$$IP = \frac{\frac{1}{4}}{\frac{1}{2} p_a + \frac{1}{2} p_b} = \frac{1}{2(p_a + p_b)}$$

Como se ha mencionado anteriormente, el índice de paternidad puede variar según los alelos del trío madre, cría y padre alegado. Habitualmente, en una prueba de parentesco se tipifican decenas de marcadores genéticos y por ende se realiza un igual número de cálculos de IP. Es conveniente en estos casos calcular el IP para todas las combinaciones de genotipos de la cría, madre y padre alegado, como se muestra en la Tabla 5.1.

Genotipo materno	Genotipo de la cría	Genotipo del padre alegado	IP
Aa	Aa		
Ab		aa	$\frac{1}{p_a}$
Bb	Ab		
Bc			
Aa			
Ab	aa		
Ac		ab	$\frac{1}{2p_a}$
Bb	Ab		
Bc			
Bc			
Cc	ac		
Cd			
		aa	$\frac{1}{p_a}$
Ab	ab	ab	$\frac{p_a p_b}{2(p_a p_b)}$
		ac	$\frac{1}{2(p_a p_b)}$

Tabla 5.1. Cálculo del índice de paternidad para las combinaciones posibles de tipo inclusión de genotipos maternos, paternos y de la cría.

5.2.2.2 Paternidad en dúos: cría y padre alegado

En la práctica veterinaria, en los casos de paternidades discutidas, es muy común no poseer la información genética de la madre. Por ejemplo, en la comparación de un toro posible padre de una o varias crías. En este caso, la evidencia consta sólo del genotipo del padre putativo G_p y el genotipo de la cría G_c . Denominaremos a las dos hipótesis de contraste en el cálculo de IP como:

H_p : el padre alegado es el padre de la cría.

H_d : algún otro individuo y no el padre alegado, es el padre de la cría.

Siguiendo el marco bayesiano utilizado anteriormente, podemos interpretar la evidencia de la siguiente manera:

$$LR = \frac{\Pr G_c / G_p, H_p}{\Pr G_c / G_p, H_d} \quad (15)$$

La probabilidad del genotipo de la cría en el denominador es independiente del genotipo del padre alegado, dado que según H_d éste último no es el verdadero padre. Por lo tanto, la ecuación se reduce a:

$$LR = \frac{\Pr G_c / G_p, H_p}{\Pr G_c / H_d} \quad (16)$$

A continuación ejemplificamos el cálculo del índice de paternidad para distintas combinaciones de genotipos del padre putativo y la cría.

Ejemplo 1.

Consideremos los siguientes genotipos del dúo: $G_p=ac$ y $G_c=ab$. Para calcular el numerador $\Pr(G_c=ab/G_p=ac, H_p)$ asumimos que el padre alegado es el verdadero padre de la cría. Como no poseemos la información de la madre, no podemos calcularlo mediante un cuadro de Punnett, como hicimos para calcular el IP en los tríos. En nuestro ejemplo el alelo a de la cría proviene del padre con probabilidad $\frac{1}{2}$, ya que el mismo es heterocigota. El alelo b es heredado de la madre y, como no poseemos la información del genotipo materno, suponemos que deriva de una madre desconocida de la población. De esta forma, le asignamos a este alelo b una probabilidad equivalente a su frecuencia génica poblacional p_b , siendo el numerador $\frac{1}{2} * p_b$. Para calcular el denominador $\Pr(G_c=ab/ H_d)$, debemos determinar la probabilidad de que el genotipo de la cría $G_c=ab$ provenga de la población. Considerando

que conocemos las frecuencias génicas poblacionales, de donde proviene el padre verdadero según H_d y asumiendo que existe equilibrio de Hardy-Weinberg (ver Anexo 5.5.3), calculamos el denominador $\Pr(G_c=ab/ H_d) = 2 \cdot p_a \cdot p_b$. Finalmente, el índice de paternidad equivale a:

$$IP = \frac{\frac{1}{2} p_b}{2 p_a \cdot p_b} = \frac{1}{4 p_a}$$

En la Tabla 5.2 se calcula el IP para todas las combinaciones posibles de genotipos de la cría y padre alegado.

Genotipo materno	Genotipo de la cría	IP
aa	Aa	$\frac{1}{p_a}$
aa	Ab	$\frac{1}{2 p_a}$
ab	Aa	$\frac{p_a \cdot p_b}{4 p_a p_b}$
ab	Ab	$\frac{1}{4 p_a}$

Tabla 5.2. Cálculo del índice de paternidad para las combinaciones posibles de tipo inclusión de genotipos paternos y de la cría.

Cuadro 5.1. Ejemplo del cálculo de las frecuencias genotípicas según el principio de Hardy-Weinberg (H-W).

Proporciones genotípicas esperadas según el principio de Hardy-Weinberg para un locus con dos alelos		Frecuencias alélicas para el esperma	
		A ₁ (p ₁)	A ₂ (p ₂)
Frecuencias alélicas para los óvulos	A ₁ (p ₁)	A ₁ A ₁ (p ₁ p ₁)	A ₁ A ₂ (p ₁ p ₂)
	A ₂ (p ₂)	A ₁ A ₂ (p ₂ p ₁)	A ₂ A ₂ (p ₂ p ₂)

Las proporciones genotípicas que se originan a partir de las frecuencias génicas de la población según el principio de H-W pueden expresarse de forma simbólica como:

Homocigotas: A_iA_i; P_{ii} = p_i²,

Heterocigotas: A_iA_j; P_{ij} = 2p_ip_j, i ≠ j.

En el caso de que una población no posea sus proporciones genotípicas de acuerdo al principio de H-W, sólo basta una generación de apareamiento al azar para alcanzarlo, pues en cada generación las proporciones genotípicas sólo dependen de las frecuencias génicas de la población. Como mencionamos anteriormente, las ecuaciones utilizadas a lo largo de este capítulo asumen que las poblaciones se encuentran en equilibrio de H-W. Sin embargo, existen modificaciones de estas fórmulas generales para ajustar los valores en situaciones donde existen desviaciones de los valores esperados para tal equilibrio. Uno de los ajustes más utilizados en las ciencias forenses es el que contempla la existencia de sub-estructuración poblacional.

5.3 PODER DE EXCLUSIÓN

La disponibilidad de varias técnicas de análisis de la variabilidad genética como los polimorfismos bioquímicos, los grupos sanguíneos y especialmente los marcadores de ADN, ha permitido su aplicación en la identificación individual y en el control de filiación. Una forma de cuantificar la eficacia de un conjunto particular de marcadores genéticos es calculando la probabilidad de exclusión (PE) *a priori*, la que se define como la probabilidad de que un sistema genético específico confiera evidencias que conduzcan a la exclusión de un determinada relación genética (ejemplo, la paternidad discutida de un padre, la correspondencia entre la evidencia y la referencia en casos forenses, etc.). Este índice se evalúa en el contexto de diferentes escenarios que se presentan habitualmente en los casos de paternidad e identificación individual. En las situaciones analizadas en este capítulo se asume que los marcadores genéticos utilizados poseen herencia de tipo codominante y están en equilibrio de ligamiento y Hardy-Weinberg (ver Anexos 5.5.3 y 5.5.4).

5.3.1 Poder de exclusión en casos de paternidad

En la sección anterior se ha definido que si un padre alegado es compatible con todos los marcadores genéticos de la cría, obtenemos una *inclusión genética*. Además, notamos que este resultado puede tener dos interpretaciones posibles: i) H_p : el padre alegado es el padre de la cría. ii) H_d : algún otro individuo de la población y no el padre alegado, es el padre de la cría. De esto surge que la efectividad de un marcador genético para resolver disputas de paternidad puede ser determinada calculando su habilidad de excluir padres falsos. Cuanto más pequeña es la probabilidad del denominador de la ecuación de verosimilitud, que en los casos de parentesco denominamos Índice de Paternidad (IP), mayor peso poseerá la evidencia.

5.3.1.1 Poder de exclusión de paternidades en tríos: $PE(p/m,c)$

Podemos calcular el poder de exclusión en los casos de paternidad considerando todas las combinaciones de genotipos maternos y de la cría y verificando en cada caso qué genotipos paternos pueden excluir la relación de paternidad. De esta manera, la sumatoria del valor de probabilidad de todas las posibles exclusiones constituye el poder de exclusión de este sistema genético. Como ejemplo, consideremos un marcador bialélico donde una madre posee el genotipo A_1A_1 y su cría A_1A_2 . Con esta información podemos determinar que el alelo materno de la cría es A_1 y el paterno A_2 . Por ende, todos los padres que no posean A_2 quedan excluidos de la paternidad. Como se trata de un locus con dos alelos, el único padre excluido puede ser el de genotipo A_1A_1 . La probabilidad de exclusión de este caso particular se calcula como:

$$\Pr(G_m=A_1A_1) * \Pr(G_c=A_1A_2/G_m=A_1A_1) * \Pr(G_p=A_1A_1) \\ p_1^2 * p_2 * p_1^2 = p_1^4 * p_2$$

En la Tabla 5.3 se muestran todas las combinaciones posibles madre, cría y padre excluido para un locus multialélico.

Madre		Cría		Padre excluido		
Tipo	Pr G_m	tipo	Pr G_c/G_m	Tipo		Pr G_p
A_iA_i	p_i^2	$A_i A_i$	p_i	$A_w A_x,$	$w, x \neq i$	$(1-p_i)^2$
		$A_i A_j$	p_j	$A_w A_x,$	$w, x \neq j$	$(1-p_j)^2$
A_iA_j $j \neq i$	$2p_i p_j$	$A_i A_i$	$p_i/2$	$A_w A_x,$	$w, x \neq i$	$(1-p_i)^2$
		$A_j A_j$	$p_j/2$	$A_w A_x,$	$w, x \neq j$	$(1-p_j)^2$
		$A_i A_j$	$(p_i + p_j)/2$	$A_w A_x,$	$w, x \neq i, j$	$(1-p_i - p_j)^2$
		$A_i A_i$	$p_k / 2$	$A_w A_x,$	$w, x \neq k$	$(1-p_k)^2$
		$A_i A_j$	$p_k/2$	$A_w A_x,$	$w, x \neq k$	$(1-p_k)^2$

Tabla 5.3. Exclusiones de paternidad para un locus multialélico.

El poder de exclusión de este marcador genético consiste en la sumatoria del producto de las tres columnas de cada fila de la tabla. Este cálculo del poder de exclusión individual PE_i puede expresarse mediante la siguiente ecuación (Jamieson y Taylor, 1994):

$$PE_i(p/m,c) = 1 - 2 \sum_{i=1}^k p_i^2 \sum_{i=1}^k p_i^3 - 2 \sum_{i=1}^k p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^k p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 - 3 \sum_{i=1}^k p_i^2 \sum_{i=1}^k p_i^3 \quad (17)$$

donde p_i corresponde a la frecuencia génica del i -th alelo y p_j la frecuencia génica del j -th alelo, siendo i diferente a j .

5.3.1.2 Poder de exclusión en dúos: $PE(p/c)$

El poder de exclusión en casos de paternidad cuando no se conoce el genotipo de uno de los progenitores (generalmente el padre) se calcula de forma similar al caso de paternidad en tríos. En este caso no existe el genotipo materno y la probabilidad de la cría, por ende, no es condicional sobre la madre. Como ejemplo, si consideramos un marcador bialélico donde la cría posee el genotipo A_1A_1 , los únicos padres excluidos en este son de genotipo A_2A_2 . La probabilidad de exclusión de este caso particular se calcula como:

$$\Pr(G_c=A_1A_1) * \Pr(G_p=A_2A_2) \\ p_1^2 * p_2^2 = p_1^2 * p_2^2$$

La probabilidad de exclusión de un marcador genético para todas las combinaciones de crías y padres excluidos puede determinarse con la siguiente ecuación (Jamieson y Taylor, 1997):

$$PE_i(p/c) = 1 - 4 \sum_{i=1}^k p_i^2 \sum_{i=1}^k 2p_i^2 - 4 \sum_{i=1}^k p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^k p_i^4 \quad (19)$$

donde p_i corresponde a la frecuencia génica del i -th alelo y k es el número de alelos

5.3.1.3 Poder de exclusión en casos de cambio de progenie: PE (c/p,m)

En este caso se desea determina el poder de exclusión de una relación de filiación entre una cría y sus dos padres putativos (por ejemplo, sustitución de progenie). En esta situación la probabilidad de exclusión (Jamieson y Taylor, 1997) se estima con la siguiente fórmula:

$$PE(c / m, p) = 1 - \frac{4 \prod_{i=1}^k p_i^2}{3 \prod_{i=1}^k p_i^2 + 2 \prod_{i=1}^k p_i^2} \quad (20)$$

donde p_i corresponde a la frecuencia génica del i -th alelo y k es el número de alelos.

5.3.2 Poder de exclusión en casos de identificación individual: PE (e/r)

El poder de exclusión de un locus cuando se comparan dos genotipos (evidencia y referencia), también denominado poder de discriminación, se obtiene calculando el complemento de la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la población presenten genotipos idénticos (*matching*). El PE en este caso se estima mediante la siguiente fórmula:

$$PE(e / r) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^k p_i^4 + 4 \sum_{j=1}^k p_j^2 \sum_{i=1}^k p_i^2}{4 \sum_{i=1}^k p_i^2 \sum_{j=1}^k p_j^2} \quad (21)$$

donde p_i y p_j corresponden a la frecuencia génica de los i -th y j -th alelos y k al número total de alelos. El primer término corresponde a todos los posibles homocigotos, y el segundo a las diferentes combinaciones posibles de genotipos heterocigotas (sin tener en cuenta el orden).

5.3.3 Poder de exclusión combinado simple y doble

La probabilidad de exclusión depende de las frecuencias génicas y del número de alelos. Si PE_i es la probabilidad de exclusión de un locus i , la probabilidad de exclusión combinada simple PEC_s de varios loci se determina calculando la probabilidad de que al menos un locus del sistema conduzca a la exclusión. O, en otras palabras, PEC_s es igual al complemento de la probabilidad de que todos los marcadores genéticos incluyan. De esta manera, calculamos el PEC_s como (Boyd, 1954; Weir, 1990):

$$PEC_s = 1 - \prod_k PE_i \quad (22)$$

donde PE_i corresponde a la probabilidad de exclusión del i -th locus y k al número de loci.

Para reducir el efecto de los errores de tipificación genética, de las mutaciones y de la presencia de alelos nulos se ha sugerido la aplicación del criterio de exclusión en más de un locus (Chakraborty *et al.*, 1974, Pemberton *et al.*, 1995). La probabilidad de exclusión combinada de dos o más loci (PEC_d) puede ser calculada como el complemento de la probabilidad que ocurra ninguna o solo una exclusión (Chakraborty *et al.*, 1974):

$$PEC_d = 1 - \prod_{i=1}^k (1 - PE_i) \prod_{i=1}^k \prod_{j=1}^k PE_j \quad (23)$$

donde PE_i corresponde a la probabilidad de exclusión del i -th locus, k al número de loci, y PE_j al poder de exclusión individual de los j -th loci diferentes del i -th locus considerado en cada término del producto.

5.3.4 Poder de exclusión para marcadores uniparentales

Las ecuaciones descritas en los apartados anteriores se refieren a marcadores autosómicos que poseen una herencia mendeliana

codominante. Como se mencionó anteriormente, cada individuo posee dos alelos para cada locus, uno heredado de cada progenitor. Sin embargo, en genética forense es un hecho común el uso de marcadores uniparentales, como el ADNmt (linaje materno) y los marcadores del cromosoma Y (linaje paterno). Estos loci, a diferencia de los anteriores, se caracterizan por poseer una sola copia o haplotipo por individuo heredada de uno de los progenitores. Es por esta razón que en los casos de identificación genética mediante marcadores uniparentales, el poder de exclusión se calcula como:

$$PE(e/r) = 1 - \prod_{i=1}^k p_i^2 \quad (24)$$

donde p_i es la frecuencia del haplotipo mitocondrial o del cromosoma Y en la población, siendo el término $\prod_{i=1}^k p_i^2$ la probabilidad de coincidencia de dos muestras tomadas al azar de la población (*random match probability*; Angleby y Savolainen, 2005).

5.5. ANEXOS

Anexo 5.1. Principios de genética de poblaciones

En este capítulo se introducen las bases estadísticas de los cálculos, tanto de los índices forenses como del poder de exclusión en los casos más frecuentes de paternidades e identificación individual. En las ecuaciones descritas para los cálculos forenses, considerábamos la hipótesis de que la evidencia y la referencia, a pesar de poseer idéntico genotipo, no eran parte del mismo animal y por lo tanto la evidencia provenía de otro individuo de la población. Asimismo, en los cálculos de los índices de paternidad, la hipótesis alternativa consideraba que el alelo paterno de la cría no provenía del padre dubitado sino de otro individuo de la población. En todos estos casos, es necesario entonces

estimar de alguna manera la probabilidad de que estos alelos o genotipos pertenezcan a la población general. La estimación de estas probabilidades constituye una parte muy importante de la genética forense y se funda en principios establecidos dentro del marco conceptual de la Genética de Poblaciones.

Para obtener la probabilidad de que un individuo seleccionado al azar de la población posea el mismo perfil genético que la evidencia de ADN, necesitamos conocer la frecuencia de dicho genotipo en la población. Estos valores generalmente se obtienen a partir de una muestra de la población total, que suele denominarse base de datos de ADN. En la práctica de rutina de los laboratorios forenses, para determinar el perfil genético de las evidencias se utilizan decenas de marcadores moleculares. Por lo tanto, para una determinada base de datos, existen miles de millones de genotipos posibles para este conjunto de marcadores utilizados, y debido a esta limitación debemos utilizar forzosamente las frecuencias génicas de cada alelo para estimar la frecuencia esperada de un cierto perfil de ADN. A consecuencia de lo expuesto, para realizar dichas inferencias estadísticas, necesitamos establecer ciertas asunciones acerca de la estructura genética de la población, y ahí es donde la Genética de Poblaciones juega un papel clave.

Anexo 5.5.2. Frecuencias alélicas y genotípicas

Es usual en genética designar a un gen con una letra y a cada alelo con un subíndice numérico. Por ejemplo A_6 se refiere al sexto alelo del locus A, y B_{12} al doceavo alelo del locus B. Cuando queremos aplicar alguna regla general o fórmula a un locus determinado, generalmente utilizamos letras como subíndices, por ejemplo i o j . Además, al referirnos a la frecuencia o proporción de un alelo determinado utilizamos la letra p con un subíndice que indica el nombre del alelo. Por ejemplo, denotamos particularmente que el alelo A_5 se encuentra en la población en una proporción del 20% como $p_5=0,2$ y generalmente que

cierto locus A_i posee una frecuencia p_i . Es importante notar que la sumatoria de las frecuencias alélicas para todos los alelos i de un locus es igual a uno, es decir .

Anexo 5.5.3. Apareamiento al azar y proporciones en equilibrio de Hardy-Weinberg

En general y de manera simplificada, en los cálculos forenses se suele asumir que los individuos de una población se reproducen en forma aleatoria. Sin embargo, es evidente que los individuos de una especie determinada no se aparean aleatoriamente. Por ejemplo, una vaca de la raza Holstein en Gran Bretaña no tiene la misma oportunidad de aparearse con un macho de la raza Holando de la provincia de Santa Fé, Argentina, que con un toro de su mismo establecimiento lechero. Sin embargo, los apareamientos no se realizan de acuerdo a los genotipos que poseen los individuos para los marcadores utilizados en los análisis forenses. En este caso, y a pesar de la separación geográfica de estos animales, si las frecuencias alélicas locales no se alejan de las halladas para la raza Holstein a nivel mundial, las proporciones genotípicas de ambas poblaciones pueden ser similares.

Las frecuencias genotípicas esperadas en una población con apareamiento al azar se denominan proporciones de Hardy-Weinberg, y surgen intuitivamente de suponer que estas proporciones son el resultado de la combinación aleatoria de las gametas que provienen de sus progenitores. Por ejemplo, pensemos en un locus que posee dos alelos A_1 y A_2 con frecuencias p_1 y p_2 , respectivamente. Los posibles genotipos para este locus surgen de la combinación aleatoria de sus alelos: A_1A_1 con frecuencia esperada $p_1 \cdot p_1 = p_1^2$; A_2A_2 con frecuencia esperada $p_2 \cdot p_2 = p_2^2$ y A_1A_2 con frecuencia esperada $p_1 \cdot p_2 + p_2 \cdot p_1 = 2 \cdot p_1 \cdot p_2$.

Anexo 5.5.4. Múltiples loci y equilibrio de ligamiento

Una población con apareamiento al azar (y en ausencia de otras fuerzas evolutivas como selección y migración) durante un cierto número de generaciones consigue un estado de equilibrio, en el cual la frecuencia de un perfil genético para varios loci (genotipo multiloci) es equivalente al producto de las frecuencias genotípicas de sus loci individuales. Cuando la población arriba a dicho estado, decimos que se encuentra en Equilibrio de Ligamiento (LE). El concepto de equilibrio de ligamiento es utilizado frecuentemente en la práctica cuando se calcula el índice forense de un conjunto de loci. El procedimiento de cálculo de este índice se conoce como ley del producto, pues consiste simplemente en multiplicar el valor del índice forense obtenido para cada loci individual.

Una diferencia importante entre el equilibrio Hardy-Weinberg y el de ligamiento es que este último no se alcanza en una sola generación de apareamiento al azar, sino en forma gradual. Para un par de loci no ligados (que no se encuentran en el mismo par de cromosomas homólogos) el desequilibrio de ligamiento (LD) se reduce a la mitad en sucesivas generaciones. Es importante notar que, aunque de una forma más gradual, los loci que se encuentran en un mismo cromosoma pueden alcanzar el estado de equilibrio. Sin embargo, la mayor parte de las aplicaciones forenses utilizan marcadores genéticos que se encuentran en distintos cromosomas homólogos y que se encuentran en LE. Otro punto a tener en cuenta es que la subestructuración poblacional actúa aumentando el LD entre algunos loci y de forma inversa reduciendo el desequilibrio entre otros marcadores. De esta forma, la ley del producto puede considerarse como una forma conservativa de calcular el índice forense para un conjunto de loci.

5.6. Referencias Bibliográficas

1. Chakraborty R., Shaw M., Schull W.J. (1974) Exclusion of paternity: the current state of the art. *Am J Hum Genet* 26:477–488
2. Evett I.W., Weir B.S. (1998) *Interpreting DNA Evidence* Sinauer Associates. ISBN 0-87983-155-4
3. Jamieson A. (1994) The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. In: *Festschrift in Honour of Dr Clyde J. Stormont*. *Animal Genetics* 25 (Supplement 1), 37–44.
4. Jamieson A. & Taylor S.C.S. (1997) Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28, 397–400.
5. Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R., Barrett J.A. (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol* 4:249–252
6. Weir B.S. (1990) *Genetic Data Analysis*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
7. Angleby H, Savolainen P. Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. *Forensic Sci Int* 2005;154:99–110.

CAPÍTULO 6

ASIGNACIÓN RACIAL

DEFINICIÓN DE RAZA. METODOS DE ASIGNACIÓN RACIAL.
PROGRAMAS Y APLICACIONES DE LA ASIGNACIÓN RACIAL

Andrés Rogberg Muñoz, Agustín H. Falomir Lockhart, Daniel E. Goszczyński

6.1 Generalidades de la asignación racial

6.1.1 ¿Qué es una raza?

El concepto de raza se aplica casi específicamente a los animales domésticos, de producción, de trabajo o de compañía. Desde el punto de vista genético suele utilizarse para designar subgrupos o poblaciones de la misma especie que presentan diferencias genéticas por estar parcialmente aisladas (natural o artificialmente), pero que son capaces de seguir reproduciéndose entre sí. El aislamiento pudo haberse originado por causas geográficas, como subgrupos que fueron llevados por los humanos a zonas aisladas (el perro sin pelo de Perú) o islas (raza bovina Jersey); por eventos de domesticación independiente (los cerdos); o, como en el caso de muchas razas modernas, por el aislamiento artificial/intencional realizado por el hombre (barrera racial). En el caso de los animales salvajes, el aislamiento geográfico que determina diferencias evolutivas a nivel fenotípico suele constituir sub-especies. Sin embargo, existen casos intermedios como algunas poblaciones de peces de criadero, donde no se utiliza el término "raza". Originalmente, muchas razas modernas se seleccionaron y diferenciaron

por características morfológicas definidas, siendo el pelaje uno de los caracteres más considerados. Como consecuencia del aislamiento se generaron diferencias, que además de observarse fenotípicamente, pueden detectarse a nivel del genoma.

6.1.2 Definición de asignación

Si bien en el ámbito veterinario y de la producción animal el concepto de raza nos es familiar, muchas veces su determinación no es tan sencilla, y la determinación de la raza de origen de un animal por algún método dado es lo que llamamos asignación racial. En general, las asociaciones de criadores de razas han definido patrones fenotípicos particulares para cada una, y un animal puede ser considerado de esa raza si se adapta a esas descripciones; sin embargo, este método es subjetivo al inspector. Por otro lado, existen registros genealógicos que avalan la pureza de un determinado individuo, aunque en muchos casos las paternidades declaradas puedan ser erróneas. Ante un contexto comprendido por el desarrollo tecnológico, los avances en genética, el acceso masivo a la información y la inclusión del análisis de ADN como una herramienta disponible, surge la posibilidad de implementar métodos de asignación racial cada vez más seguros y confiables. En este sentido, podemos definir la asignación racial molecular como la determinación de la raza de un animal a través de un estudio de ADN con fines de control, comercialización, trazabilidad, forenses, u otra naturaleza.

Un punto a tener en cuenta para asignar la raza de un individuo es que, independientemente del método de asignación racial utilizado, se requiere de un patrón previamente definido para la raza y con el cual se hará la comparación. Por ejemplo, si el método usado se basa en características observables a simple vista (fenotípicos en el animal vivo) será necesaria una descripción minuciosa de las características morfológicas y de pelaje aceptadas, mientras que si el método se basa en estudios de ADN, se requerirá una base de datos poblacional

compuesta por un número de animales pura de la raza previamente genotipados para los mismos marcadores a utilizar para la asignación racial (ver capítulo 4).

6.1.3 Características de clasificación de razas en las especies domésticas

En la Tabla 1 se detallan algunos de los criterios que se utilizan para clasificar y diferenciar las razas de diferentes especies de animales domésticos. Estos criterios son utilizados para la asignación racial a nivel fenotípico y en algunos casos hasta pueden determinar que un animal sea reconocido o no como miembro de una raza.

		CRITERIO DE CLASIFICACIÓN			
Especie	Color de capa	Origen	Morfológico	Función	
MAMÍFEROS	Gato	Sí	País de origen de la raza	Estructura corporal/Tamaño corporal/ Largo del pelo	----
	Vacuno	Sí	Centro de Domesticación (Medio Oriente/India)	Presencia y forma de cuernos/Largo prepucio/ Tamaño y forma gibas/Largo del pelo/otros	Lechero/Carnicero/Trabajo
	Perro	Sí	----	Tamaño corporal (pequeños/medianos/grandes/gigantes)	Deportivo/Terrier/Caza/ Trabajo/Compañía/Pastores
	Búfalo	Sí	País de origen de la raza	Tamaño corporal/Forma y largo cuernos	Lechero/Carnicero/Trabajo
	Cerdo	Sí	Centro de Domesticación (Europa/Asia)	Tamaño corporal	De producción/mascotas
	Cabra	Sí	----	Tamaño corporal	Lechero/Carnicero/Fibra
	Equino	Sí	País de origen de la raza	Peso/Altura/Modo de andar/ Temperamento	Trabajo/Deportes/Paseo
	Conejo	Sí	País de origen de la raza	Tamaño/Tipo de oreja/Largo de pelo	Carne/Piel/Pelo
	Ovino	Sí	----	Tipo y largo de lana/ Presencia o ausencia de cuernos	Lechero/Carnicero/Lana
AVES	Gallina	Sí	País de origen de la raza	Tamaño corporal/Color de piel/Cantidad de plumas/Color de huevos/otros	Huevos/Carne/Ornamental
	Pavo	Sí	País de origen de la raza	Tamaño corporal (Pesado/liviano)	----

Tabla 6.1: Criterios de clasificación de las razas dentro de las principales especies de animales domésticos.

6.2 Métodos de asignación racial

La raza de un animal puede determinarse genéticamente desde dos enfoques: por métodos determinísticos, basados en el análisis de marcadores específicos de raza (por ejemplo, genes asociados a color de capa o piel), y por métodos probabilísticos, que determinan la similitud o la distancia entre el genotipo del animal muestreado con respecto a una poblaciones de referencia (animales puros).

6.2.1 Métodos determinísticos

Para generar una característica visual diferencial, muchas razas fueron seleccionadas hacia unos pocos o un único patrón de pelaje. Consecuentemente, los genes de pigmentación fueron sometidos a una presión selectiva durante mucho tiempo, y por ese motivo la búsqueda de marcadores raciales privativos se enfocó inicialmente sobre características. Los análisis comenzaron en ratones, y se trasladaron por homología a las especies domésticas, dando lugar al estudio de genes como MC1R (Receptor de Melanocortina 1), ASIP (proteína de señalización agutí) y TYRP1 (Proteína relacionada a tirosinasa 1), entre otros. Estos genes desempeñan roles importantes en la vía de síntesis de la melanina (Bennett y Lamoreux 2003).

Para mencionar algunos ejemplos, en bovinos el gen MC1R presenta dos mutaciones, cuyos alelos determinan la prevalencia de eumelanina (cabello de capa negro) y feomelanina (cabello rojo o amarillo); algunos estudios señalan que este gen actúa de manera similar en cerdos. El gen ASIP ha sido asociado a variaciones en el color de pelaje de las ovejas, y el gen TYRP1 está correlacionado a variaciones de color en vacas, ovejas y cerdos. Finalmente, el gen KIT ha sido asociado al color blanco dominante en cerdos domésticos, y estudios recientes sugieren que también podría estar relacionado con los patrones de manchas blancas en razas lecheras bovinas.

La elección de un método determinístico para una asignación racial no siempre resulta adecuada y dependerá de cada problemática en

particular ya que el método requiere alelos exclusivos de cada raza a diferenciar. Por ejemplo, si utilizamos genes relacionados con la determinación del pelaje, no podríamos diferenciar razas con pelajes similares. Sin embargo, existen ejemplos donde estos métodos han sido utilizados con éxito. En el año 2002, Maudet y Taberlet utilizaron por primera vez tres mutaciones ubicadas en el gen MC1R para autenticar tres quesos franceses (con denominación de origen, RDO). Los quesos Beaufort, Abondance y Reblochon deben ser producidos sólo por las razas lecheras Montbéliard, Abondance y Tarentaise, y en el estudio se pudo detectar algunas adulteraciones por la utilización de leche Holstein en la fabricación. Los investigadores determinaron las frecuencias de cuatro variantes alélicas en el gen MC1R y encontraron variantes exclusivas para las razas. En la Tabla 6.2 se muestran los datos adaptados del trabajo original (Maudet y Taberlet, 2002).

Raza	Color de capa	Genotipo
Abondance	Marrón y blanco	e/e (AA)
Montbéliard	Rojo y blanco	e/e (AA)
Tarentaise	Rojizo con negro	E1/E1 (BB) o E+/E1 (BC)
Holstein	Blanco y negro	E ^D E ^D (DD)

Tabla 6.2. Genotipos del gen MC1R en diferentes razas lecheras criadas en Francia: Abondance, Montbéliard, Tarentaise y Holstein (Adaptada de Maudet y Taberlet, 2002).

Como se puede observar en la Tabla, la raza Holstein posee el alelo ED fijado (y exclusivo de la raza en este contexto). Las razas Abondance y Montbéliard presentan el mismo genotipo (e/e) y no podría diferenciarse una de otra utilizando este método, aunque sí los quesos provenientes de la raza Tarentaise (siempre en el contexto de estas cuatro razas). Sin embargo, los genotipos de las tres razas francesas se diferencian completamente del Holstein; por lo tanto, al detectar el alelo ED en una muestra, se puede demostrar la adulteración con otra raza diferente a la Abondance, Montbéliard y Tarentaise (probablemente Holstein).

6.2.2 Métodos probabilísticos

Partiendo de la idea de que el genotipo de un individuo es más parecido a los de su población de origen que a los de cualquier otra población, es posible determinar la raza de pertenencia por funciones de máxima verosimilitud, estadística bayesiana o distancias genéticas. Por supuesto, esto requiere una base de datos poblacional previa que incluya un número representativo de animales por raza a asignar (ver capítulo 4).

6.2.2.1 Métodos de máxima verosimilitud

Los métodos de máxima verosimilitud son procedimientos matemáticos que consideran los datos observados como muestras de procesos aleatorios, o modelos cuyos parámetros son desconocidos. Dada una distribución de probabilidad D , con una densidad de probabilidad L_d , caracterizada por un parámetro θ , y dada una muestra de x_i datos observados para $i = 1 \dots n$, la probabilidad asociada a los datos observados puede ser calculada como:

$$P(\{x_i\}_{i=1}^n | \theta) = L_d(\theta | \{x_i\}_{i=1}^n)$$

Si el parámetro θ no es conocido, es posible inferir sobre su verdadero valor a partir de la muestra θ . El método de máxima verosimilitud busca, en el espacio de todos los valores posibles, el valor de θ que maximiza la probabilidad de haber observado la muestra dada. La incertidumbre asociada a esta estimación se expresa normalmente por los intervalos de confianza del 95% para θ .

6.2.2.2 Métodos bayesianos

Los métodos bayesianos infieren los parámetros del modelo combinando la máxima verosimilitud con la información previa. La información sobre el parámetro θ debe expresarse mediante la

especificación de una distribución previa $P(\theta)$. La distribución $P(\theta)$ es ponderada hacia el θ más probable de acuerdo a la información previa disponible. El resultado es la probabilidad posterior, que corresponde a nuestras creencias acerca de los parámetros, teniendo en cuenta tanto los datos anteriores como los observados. Suponiendo que las frecuencias alélicas en cada locus de cada población tienen a priori una igual densidad de probabilidad, la probabilidad posterior de observar individuos con el genotipo $A_k A_k$ en el locus j de la población i es igual a:

$$\frac{(n_{ijk} + 1/K_j + 1)(n_{ijk} + 1/K_j)}{(n_{ij} + 2)(n_{ij} + 1)} \quad \text{si } k = k'$$

donde n_{ijk} es el número de alelos k muestreados en el locus j en la población i ; n_{ij} es el número de genes muestreados en la población i ; y k_j es el número total de alelos observados en todas las poblaciones en el locus j . Esto nos indica la probabilidad de que un individuo pertenezca a una población y se puede utilizar como un umbral o criterio de asignación.

6.2.2.3 Métodos de distancia genética

Los métodos de distancia genética asignan la población desconocida a la más cercana, es decir, la población desconocida se aparea con la que genera distancia genética promedio menor. Se utilizan cálculos de distancia genética como la estándar de Nei, Chord, o Da (Takezaki y Nei, 1996). La asignación basada en distancia no requiere una matemática compleja; se puede adaptar a las propiedades de los marcadores moleculares y está libre de supuestos de Hardy-Weinberg o desequilibrios de ligamiento. Su principal desventaja es la falta de una probabilidad asociada a la asignación.

6.2.2 Programas de asignación

Los programas más comúnmente usados para la asignación racial se listan en la Tabla 6.3. El uso de cada uno de ellos debe ser evaluado dependiendo del marco de la problemática a resolver y el tipo y número de marcadores disponibles.

Programa	Criterio	Marcador		Enlace
		Tipo	Densidad	
GeneClass2	Distancia genética	STR SNP RFLP AFLP	Baja densidad (no pueden estar ligados)	www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/GeneClass
	Frecuencia génica			
	Bayesiano			
Structure	Bayesiano	STR SNP RFLP AFLP	Baja densidad (no pueden estar ligados)	pritchardlab.stanford.edu/structure.html
Admix	Bayesiano	SNP	Baja y Alta densidad	www.genetics.ucla.edu/software/admixture
FastStructure	Bayesiano	SNP	Baja y Alta densidad	rajanil.github.io/fastStructure
BAPS	Bayesiano	SNP	Baja y Alta densidad	www.helsinki.fi/bsg/software/BAPS
Wichrun	Máxima verosimilitud	STR	Baja densidad	bml.ucdavis.edu/research/research-programs/ecology-evolution-conservation/salmon-research/salmon-genetics-software

Tabla 6.3: Características de los programas más utilizados para la asignación racial a partir de datos de marcadores moleculares.

6.3 Usos de los métodos de asignación

Los métodos de asignación racial, además de ser variados, tienen una gran diversidad de utilidades en diferentes áreas: i) en el campo de la producción, para certificar determinados productos, acreditar sus condiciones de elaboración y su origen, tomar decisiones y mejorar los esquemas productivos (principalmente en casos de razas compuestas y

cruzamiento); ii) en el campo de la biodiversidad, para apoyar la conservación de razas a través de sus relaciones e historia; iii) en el campo de la justicia, como soporte a pericias en casos judiciales.

6.3.1 Certificación de productos alimenticios

En un mundo cada vez más globalizado, la certificación de la inocuidad, calidad y procedencia de los productos de origen animal se ha vuelto un tema de gran importancia. En los últimos años se han sucedido eventos sanitarios que han provocado que consumidores individuales, asociaciones de consumidores e incluso países compradores de estos productos, empiecen a demandar controles sobre los productos que compran, su producción y transporte. Los ejemplos de mayor difusión abarcan zoonosis, como la gripe aviar y la gripe porcina, enfermedades relacionadas al tipo de alimentación que consumen los animales, como la encefalopatía espongiforme bovina, e intoxicaciones por el consumo de subproductos animales con alto contenido de químicos tóxicos, como la crisis de las dioxinas. Estos ejemplos ponen de manifiesto la importancia de controlar tanto el producto como el animal y el sistema de producción. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud posee dos programas relacionados al consumo de alimentos: Seguridad Alimentaria (*Food Safety* <http://www.who.int/foodsafety/en/#>) y “Vigilancia de intoxicaciones alimentarias” (*Foodborne Disease Surveillance* http://www.who.int/foodborne_disease/en/#).

En este contexto, la asignación racial puede ser una herramienta que indirectamente resuelva algunas de estas cuestiones. Se podría pensar que el hecho de conocer la raza de un individuo nos brinda una limitada información. Sin embargo, ciertas razas poseen atributos de calidad superiores a otras y una determinación racial podría asegurarnos una cierta calidad (mínima al menos). Aunque las posibilidades son más amplias, la raza nos puede dar información geográfica, ya que hay razas que se crían casi exclusivamente en algunos países o regiones, o hay

países o regiones donde no se crían determinadas razas. Más aún, dado que el ecosistema y/o el modo de producción de ciertas regiones son particulares o exclusivos, y muchas veces algunas razas fueron seleccionadas y criadas exclusivamente en esas mismas regiones, la certificación racial podría estar dándonos también información sobre la producción. Pero veamos más en detalle cada una de las situaciones que mencionamos:

6.3.1.1 Calidad

Cuando hablamos de alimentos, en la mayoría de los casos la calidad de los mismos no puede ser testada o probada por el consumidor previo a su compra. Como se mencionó, existen razas o poblaciones que poseen atributos exclusivos de calidad y la certificación racial podría asegurar una calidad mínima al consumidor. Algunas razas o comercializadores de productos alimenticios de origen animal han aprovechado este reconocimiento para generar marcas propias o certificaciones que agregan valor a sus productos y en algunos casos logran distribuir el beneficio en la cadena de producción. Veamos algunos ejemplos:

Carne Angus Certificada: es el programa de la Asociación Argentina de Angus; en su página web aparecen varios criterios para la certificación, algunos raciales como el pelaje (negro o colorado sólido típico del Angus) y el carácter mocho (absoluto en la raza) y otros de calidad que también se le atribuyen a la raza (Wheeler et al., 2005), como la muscularidad, la madurez/edad, la buena tipificación de la canal, grasa de cobertura y marmoleado. Todos caracteres fenotípicos y de calidad.

Munchi's y San Isidro Labrador: estas marcas de productos lácteos alegan la calidad de sus productos debido al uso de leche obtenida de animales de raza Jersey. La raza Jersey es reconocida por el mayor contenido de sólidos en la leche (Auld et al., 2004).

Jamón Ibérico: es una denominación de origen y de calidad del jamón español criado a partir de animales con al menos un 50% de sangre de razas Ibéricas. Esta certificación contempla además una certificación del proceso de alimentación (Gobierno de España/Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marítimo 2014).

Raza Nostra: portal y carnicería española que vende carne de razas bovinas, ovinas y suinas reconocidas y certificadas (Raza Nostra 2014).

6.3.1.2 Trazabilidad

La trazabilidad es un término muy amplio que puede utilizarse para productos y procesos, en particular productos de origen animal. Existen varias definiciones, por ejemplo, las Normas ISO 8402 la definen como “la capacidad de establecer la historia de los procesos de origen de un producto, su uso y procedencia mediante referencia a un registro escrito”, mientras que la Regulación Europea (ER) 178/2002 la define como “la habilidad para trazar y seguir un animal, un alimento o un ingrediente a través de todas las etapas de producción y distribución”. En el caso de los animales, se han generado varios métodos de identificación para los individuos en las etapas productivas como caravanas, bolos ruminales, análisis retinal, entre otros, que luego requieren una continuidad a nivel de faena, empaque y distribución. Por otro lado, el ADN ha demostrado ser una herramienta utilizable para el seguimiento en toda la cadena, desde los animales hasta sus derivados alimenticios, ya que se encuentra en toda célula nucleada del individuo (es decir en cualquier tejido) y se mantiene inalterado con la mayoría de los tratamientos de cocción, conservación o curado.

Si bien los métodos de asignación racial no pueden identificar individuos, debido a que no es el objetivo del análisis, pueden en ciertos contextos servir como control de fraudes. En las diferentes regiones del mundo las razas criadas varían notoriamente, esto se debe principalmente a condiciones climáticas e históricas. De este modo se

podría chequear la adulteración de productos animales provenientes de ciertas regiones con productos locales de inferior calidad y/o más baratos. Un ejemplo de esta utilidad se puede encontrar en un estudio realizado por nuestro grupo (Rogberg-Muñoz et al., 2014) donde se testeó la posibilidad de identificar carne Argentina en el mercado chino. En el contexto de las crecientes importaciones de carne en China y la informalidad remanente del mercado cárnico interno, pueden ocurrir adulteraciones que impliquen el etiquetado de carne producida localmente como carne importada. China es uno de los principales productores de carne del mundo (y principales consumidores en total a nivel país) y su producción se basa en el ganado local llamado Ganado Amarillo Chino, aunque prácticamente toda esta producción es volcada al mercado interno. La carne importada proviene mayoritariamente de países donde las razas europeas son mayoritarias, por lo tanto una asignación racial podría servir para la búsqueda de fraudes en los que carne local se etiquete como importada.

6.3.1.3 Denominación de origen

Ya se mencionó que las razas producidas en diferentes países del mundo pueden ser distintas, pero en algunas regiones (incluso pequeñas áreas) pueden llegar a ser exclusivas y esto ha sido aprovechado para agregar valor al producto. La Comunidad Europea en sus regulaciones 509/2006 y 510/2006 (Unión Europea 2006) establece tres certificaciones para productos regionales:

Protected designation of origin (PDO): se refiere a productos originarios de una determinada área o región, que asegura condiciones ambientales y de producción exclusivas del área.

Protected geographical indication (PGI): se refiere a productos originarios de una determinada área o región, que asegura una determinada calidad debido a condiciones ambientales y de producción de esa área (pueden o no ser exclusivas).

Traditional speciality guaranteed (TSG): se refiere a productos elaborados con materias primas y procesos tradicionales, que lo hacen diferente a otros.

Existen numerosos trabajos que utilizan la asignación racial por ADN para dar soporte a este tipo de certificaciones. En el trabajo realizado por Negrini et al. (2008) se demostró la utilidad de un set de 90 SNP para identificar la carne de cuatro regiones Europeas que cuentan con PGI: “Guaranteed Pure Highland Beef” (Escocia), “Vitellone dell’Appennino Centrale” (Italia), “Ternera de Navarra” (España) y “Boeuf de Chalosse” (Francia), con resultados que fueron superiores al 80% de efectividad. Por su parte, investigadores españoles han demostrado la utilidad de 25 microsatélites para determinar y certificar la composición racial de la PDO “Jamón Ibérico” (García et al., 2006). Bajo un enfoque determinístico, Russo et al. (2007) desarrollaron un test de ADN utilizando el locus MC1R (responsable de la coloración de pelaje) para autenticar quesos “Parmigiano Reggiano” producidos únicamente con leche de la raza Reggiana. En ese momento estos quesos tenían un valor de mercado que duplicaba el de quesos similares sin denominación de origen.

6.3.2 Pureza, cruzamientos e híbridos

Una posible utilidad de la asignación racial es la determinación del grado de pureza de un animal. En razas que poseen un registro abierto y/o que la absorción está permitida, la determinación de la proporción de genes de la raza pura nos puede permitir definir si un animal es lo suficientemente puro para ser aceptado como “Puro”. En general, se acepta que un animal es puro luego de un número de generaciones en las que se utilizó un progenitor puro. Este número de generaciones puede variar, pero luego de 5 generaciones el porcentaje del genoma de la raza absorbente es casi 97% y luego de 7 generaciones ese porcentaje es mayor a 99%. Alternativamente, un análisis de ADN con un número adecuado de marcadores nos puede determinar más

exactamente ese valor y adelantar el proceso de absorción eligiendo a los animales que poseen una mayor porción del genoma de la raza absorbente (Hillel et al., 1990). Por otro lado, existen casos en que algunos criadores pudieran utilizar animales de otras razas para corregir o modificar un carácter, frente a la duda la organización responsable del registro (o el comprador del animal) podría solicitar un análisis que confirme su pureza. En el caso de los Labradores de color plateado, algunos criadores alegan que es una variante natural y otros que fue por cruzamiento con Weimaraner. Si bien el American Kennel Club se expidió al respecto en el 2000, aún existe controversia.

Otro aspecto a considerar son las evaluaciones genéticas basadas en datos fenotípicos (evaluaciones bajo un Modelo Animal). En general los programas de evaluación son llevados a cabo por las Asociaciones de Criadores de cada raza e incluyen animales puros o con un cierto grado de pureza. Sin embargo existen razas de origen mixto o compuestas (Brangus y Braford en bovinos, PampINTA en ovinos) formadas por la cruce de dos o más razas, o programas de cruzamiento en los que participan varias razas. En estos casos, la determinación racial por ADN podría ayudar a determinar qué porcentaje exacto de cada raza posee cada individuo y así poder predecir mejor el mérito genético de los animales a ser seleccionados (VanRaden et al., 2007).

Asimismo, se puede considerar un cruzamiento entre individuos de dos especies diferentes, aunque en general no son buscados estos cruzamientos y mucho menos evaluados. Sin embargo, existen varios casos entre los animales domésticos, como el cruzamiento entre burros y caballos, cabras y ovejas, vacunos y yak (*Bos grunniens* en Asia), o entre animales domésticos y salvajes como cerdos con chanchos jabalíes, perros con zorros o lobos y cruzamiento entre camélidos americanos (llamas con guanaco o alpacas con vicuñas). En algunos de estos casos puede ser necesaria la identificación de su carácter híbrido por cuestiones comerciales o legales, por ejemplo en el tráfico ilegal de animales (Di Rocco et al., 2011).

6.3.3 Programas de conservación

En el mundo existen alrededor de 7.600 razas que corresponden a 18 especies de mamíferos y 16 de aves (Groeneveld et al., 2010), algunas de las cuales se encuentran en extinción debido a la consanguinidad y el cruzamiento con otras razas. Los estudios moleculares pueden ayudar a determinar la diversidad conservada en una determinada raza, como también la relación entre diferentes razas para ayudar a la conservación de razas en peligro de extinción o con un alto grado de consanguinidad. En este sentido se puede utilizar otras razas muy cercanas genéticamente para expandir los rodeos o aumentar la variabilidad genética de una determinada población y así conservar sus aptitudes diferenciales. Por ejemplo en ovinos, Baumung et al. (2006) investigaron la diversidad de razas austríacas y lograron establecer la relación entre las diferentes razas de ese país y la recomendación de conservación de alguna de ellas.

6.3.4 Casos forenses

En el área forense, los animales pueden ser las víctimas (ya sean robados, atacados o hasta muertos), los atacantes (de personas, otros animales o de la propiedad privada), los responsables de accidentes, o la prueba que conecte al sospechoso con la escena del crimen, por ejemplo a través de los rastros de ADN en mordidas o pelos encontrados en pertenencias del sospechoso.

6.3.4.1 Mascotas

En los animales de compañía, la asignación racial suele ocupar un espacio histórico-científico o simplemente se realiza por la curiosidad del dueño del animal (Kurushima et al., 2013). Sin embargo, la asignación racial puede dar información sobre posibles enfermedades o susceptibilidades que pueda tener un perro o un gato; más aún, en el área forense se ha sugerido la utilización de la asignación racial en casos de ataque de perros a humanos, ya que las razas Pit Bull y

Rottweiler han sido las que más ataques realizaron en EEUU. En este sentido, el determinar la raza del perro puede ayudar a resolver casos judiciales (Kanthaswamy et al., 2009).

6.3.4.2 Peces

Como se comentó anteriormente, el concepto de raza aplicado a los peces se puede asimilar a las poblaciones de una misma especie que por eventos geográficos han quedado casi aisladas unas de otras y han sufrido una deriva génica en consecuencia. Se ha propuesto la utilización de métodos de asignación racial para la detección del origen geográfico del pescado comercializado y el control de las áreas utilizadas por los barcos pesqueros (Ozerov et al., 2013). Por otra parte, estos métodos han demostrado ser útiles en el control y la certificación de la pesca deportiva. En el año 2000, Primmer et al. detectaron un intento de fraude en un concurso de pesca de salmones en Finlandia cuando un pescador intentó ganar el concurso con un espécimen traído de otro lago cercano, en donde los peces tienen un mayor tamaño medio.

6.3.4.3 Animales silvestres

Así como en la pesca, existen regulaciones a nivel mundial para la caza de determinados animales y prohibición para las especies en peligro (Cirelli, 2002). Sin embargo, la caza ilegal persiste. En estos casos forenses es muy común que los imputados aleguen que los restos animales son de especies domésticas, y si las especies silvestres son muy cercanas a las domésticas, estos mismos métodos se pueden aplicar para diferenciarlas (diferenciación de especie). Se han publicado varios artículos con ejemplos relacionados a la caza ilegal, por ejemplo, se han utilizado estas técnicas para detectar la caza y venta de Cacatúas en Australia (White et al., 2012), matanzas de Lobos en Italia (Caniglia et al., 2010) y de muflones en España (Lorenzini et al., 2011).

6.3.4.4 Casos judiciales

Al momento de realizar un estudio de ADN, ya sea de paternidad o de identificación genética por comparación de perfiles, es muy importante la base de datos de referencia para el cálculo de la probabilidad (índice de paternidad o forense, ver capítulo 5) y exactitud del resultado. En este sentido, Lirón et al. (2007) sugirieron que un análisis previo de la raza de los individuos involucrados permitiría usar las frecuencias específicas de raza o grupo racial y obtener un resultado más exacto.

6.4 Referencias Bibliográficas

- AKC. "American Kennel Club." <http://www.akc.org/> (June 3, 2014).
- Auldist, Martin J, Keith A Johnston, Nicola J White, W Paul Fitzsimons, and Michael J Boland. 2004. "A Comparison of the Composition, Coagulation Characteristics and Cheesemaking Capacity of Milk from Friesian and Jersey Dairy Cows." *The Journal of dairy research* 71(1): 51–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068067> (February 3, 2014).
- Baumung, R, V Cubric-Curik, K Schwend, R Achmann, and J Sölkner. 2006. "Genetic Characterisation and Breed Assignment in Austrian Sheep Breeds Using Microsatellite Marker Information." *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* 123(4): 265–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882093>.
- Bennett, Dorothy C., and M. Lynn Lamoreux. 2003. "The Color Loci of Mice - A Genetic Century." *Pigment Cell Research* 16(4): 333–44. <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034%2Fj.1600-0749.2003.00067.x> (May 1, 2014).
- Caniglia, Romolo, Elena Fabbri, Claudia Greco, Marco Galaverni, and Ettore Randi. 2010. "Forensic DNA against Wildlife Poaching: Identification of a Serial Wolf Killing in Italy." *Forensic science*

international. Genetics 4(5): 334–38.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497309001628>

(February 25, 2014).

Cirelli, MT. 2002. "PROTECCIÓN Y ORDENACIÓN DE LA FAUNA." In *Tendencias Legislativas En La Ordenación de La Fauna*, Rome: Servicio del Derecho para el Desarrollo, Oficina Jurídica de la FAO.

<http://www.fao.org/docrep/005/Y3844S/Y3844S00.HTM> (March 12, 2014).

García, David, Amparo Martínez, Susana Dunner, José L Vega-Pla, Cristina Fernández, Juan V Delgado, and Javier Cañón. 2006. "Estimation of the Genetic Admixture Composition of Iberian Dry-Cured Ham Samples Using DNA Multilocus Genotypes." *Meat science* 72(3): 560–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22061741> (January 13, 2014).

Gobierno de España/Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marítimo. 2014. "Norma de Calidad de La Carne, El Jamón, La Paleta Y La Caña de Lomo Ibéricos." *BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO*: 1569–85. <http://www.boe.es/boe/dias/2014/01/11/pdfs/BOE-A-2014-318.pdf>.

Groeneveld, L F, J a Lenstra, H Eding, M a Toro, B Scherf, D Pilling, R Negrini, E K Finlay, H Jianlin, E Groeneveld, and S Weigend. 2010. "Genetic Diversity in Farm Animals--a Review." *Animal genetics* 41 Suppl 1: 6–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500753> (June 5, 2014).

Hillel, J., T. Schaap, A. Haberefeld, A. J. Jeffreys, Y. Plotzky, A. Cahaner, and U. Lavi. 1990. "DNA Fingerprints Applied to Gene Introgression in Breeding Programs." *Genetics* 124(3): 783–89. <http://www.genetics.org/content/124/3/783.short> (June 2, 2014).

Kanthaswamy, Sree, Bradley K Tom, Anna-Maria Mattila, Eric Johnston, Melody Dayton, Jennifer Kinaga, Bethany Joy-Alise Erickson, Joy Halverson, Dennis Fantin, Sue DeNise, Alexander Kou, Venkat Malladi, Jessica Satkoski, Bruce Budowle, David Glenn Smith, and Mikko T Koskinen. 2009. "Canine Population Data Generated from a Multiplex STR Kit for Use in Forensic Casework." *Journal of forensic sciences*

54(4): 829–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486242> (June 11, 2014).

Kurushima, J D, M J Lipinski, B Gandolfi, L Froenicke, J C Grahn, R a Grahn, and L a Lyons. 2013. “Variation of Cats under Domestication: Genetic Assignment of Domestic Cats to Breeds and Worldwide Random-Bred Populations.” *Animal genetics* 44(3): 311–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23171373> (January 13, 2014).

Lirón, Juan P, María V Ripoli, Pilar Peral-García, and Guillermo Giovambattista. 2007. “Implication of Population Structure in the Resolution of Cattle Stealing Cases.” *Journal of forensic sciences* 52(5): 1077–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17680792> (June 11, 2014).

Lorenzini, Rita, Pierangela Cabras, Rita Fanelli, and Giuseppe L Carboni. 2011. “Wildlife Molecular Forensics: Identification of the Sardinian Mouflon Using STR Profiling and the Bayesian Assignment Test.” *Forensic science international. Genetics* 5(4): 345–49. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497311000342> (February 21, 2014).

Maudet, C, and P Taberlet. 2002. “Holstein’s Milk Detection in Cheeses Inferred from Melanocortin Receptor 1 (MC1R) Gene Polymorphism.” *Journal of dairy science* 85(4): 707–15. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(02\)74127-1/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(02)74127-1/abstract) (April 28, 2014).

Negrini, R, L Nicoloso, P Crepaldi, E Milanese, R Marino, D Perini, L Pariset, and S Dunner. 2008. “Traceability of Four European Protected Geographic Indication (PGI) Beef Products Using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian Statistics.” *Meat science* 80: 1212–17.

Ozerov, Mikhail, Anti Vasemägi, Vidar Wennevik, Rogelio Diaz-Fernandez, Matthew Kent, John Gilbey, Sergey Prusov, Eero Niemelä, and Juha-Pekka Vähä. 2013. “Finding Markers That Make a Difference: DNA Pooling and SNP-Arrays Identify Population Informative Markers for

Genetic Stock Identification.” *PloS one* 8(12): e82434. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3864958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 7, 2014).

Primmer, C R, M T Koskinen, and J Piironen. 2000. “The One That Did Not Get Away: Individual Assignment Using Microsatellite Data Detects a Case of Fishing Competition Fraud.” *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 267(1453): 1699–1704. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1690726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 12, 2014).

Raza Nostra. 2014. “Marcas de Calidad de Raza Nostra.” <http://www.razanostra.com/RazaNostra-MarcasdeCalidad.htm> (March 2, 2014).

Di Rocco, F, D M Posik, M V Ripoli, S Díaz, M L Maté, G Giovambattista, and L Vidal-Rioja. 2011. “South American Camelid Illegal Traffic Detection by Means of Molecular Markers.” *Legal medicine (Tokyo, Japan)* 13(6): 289–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982877> (June 8, 2014).

Rogberg-Muñoz, A, S Wei, MV Ripoli, BL Guo, MH Carino, N Castillo, EE Villegas Castagnaso, JP Lirón, HF Morales Durand, L Melucci, E Villarreal, P Peral-García, YM Wei, and G Giovambattista. 2014. “FOREIGN MEAT IDENTIFICATION BY DNA BREED ASSIGNMENT IN CHINESE MARKET.” *Meat Science*.

Russo, Vincenzo, Luca Fontanesi, Emilio Scotti, Marco Tazzoli, Stefania Dall’Olio, and Roberta Davoli. 2007. “Analysis of Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene Polymorphisms in Some Cattle Breeds: Their Usefulness and Application for Breed Traceability and Authentication of Parmigiano Reggiano Cheese.” *Italian Journal of Animal Science* 6(3): 257–72.

<http://www.aspajournal.it/index.php/ijas/article/view/ijas.2007.257> (March 10, 2014).

Takezaki, N., and M. Nei. 1996. "Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA." *Genetics* 144(1): 389–99. <http://www.genetics.org/content/144/1/389> (June 4, 2014).

Unión Europea. 2006. "EU Agricultural Product Quality Policy." http://ec.europa.eu/agriculture/quality/index_en.htm (March 12, 2014).

VanRaden, P M, M E Tooker, J B Cole, G R Wiggans, and J H Megonigal. 2007. "Genetic Evaluations for Mixed-Breed Populations." *Journal of dairy science* 90(5): 2434–41. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207717411> (June 9, 2014).

Wheeler, TL, LV Cundiff, S. D. Shackelford, and M. Koohmaraie. 2005. "Characterization of Biological Types of Cattle (Cycle VII): Carcass, Yield, and Longissimus Palatability Traits." *Journal of Animal Science* 83: 196–207. <http://www.animal-science.org/content/83/1/196.short> (February 3, 2014).

White, Nicole E, Rick Dawson, Megan L Coghlan, Silvana R Tridico, Peter R Mawson, James Haile, and Michael Bunce. 2012. "Application of STR Markers in Wildlife Forensic Casework Involving Australian Black-Cockatoos (*Calyptorhynchus* Spp.)." *Forensic science international. Genetics* 6(5): 664–70. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497311001943> (January 24, 2014).

CAPÍTULO 7

IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA EN ANIMALES DOMÉSTICOS

FUNDAMENTOS Y MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN EMPLEADOS PARA LA
ASIGNACIÓN DE UN INDIVIDUO O UNA MUESTRA BIOLÓGICA A SU ESPECIE DE
ORIGEN

*Diego Manuel Posik, Marcela Gonçalves Drummond, Lissandra Sousa
Dalsecco, Danilo Alves Pimenta-Neto, Denise Aparecida Andrade de Oliveira,
Guillermo Giovambattista*

7.1. Introducción

En los últimos veinte años, el análisis de ADN ha revolucionado la ciencia forense y se ha convertido en una herramienta de suma importancia a la hora de aplicar la ley. Por otra parte, surgieron circunstancias que han llevado a la necesidad de identificar la especie de origen a la que pertenece una muestra biológica desconocida.

Entre los motivos que llevan a la identificación de la especie a la que pertenece una muestra, se encuentran:

i) La aparición de nuevas enfermedades transmitidas por animales, como la influenza aviar y la fiebre aftosa. El caso más emblemático fue el de la aparición en Inglaterra en el año 1996 de un brote de encefalopatía espongiforme bovina (más conocida como mal de la vaca loca), en la que se vieron afectados miles de animales. Una vez confirmada la posibilidad de transmisión de estos nuevos agentes infecciosos (los priones) desde los bovinos al hombre, las legislaciones

de la Unión Europea y de los Estados Unidos prohibieron el uso de proteínas derivadas de tejidos de rumiantes para alimentar animales de consumo humano (Rastogi et al., 2007). La rápida identificación de las materias primas que forman parte de un alimento o un alimento balanceado permite el rápido control del brote de una enfermedad. (Hedlin et al., 2012).

ii) Las malas prácticas de parte de algunos productores de alimentos en las que se reemplazan materias primas de una especie de mayor valor comercial (pescados, carne, leche) por otras de menor valor, sobre todo cuando existen marcadas diferencias de precio o problemas de disponibilidad en el mercado.

Por ejemplo, a comienzos de 2013, la Unión Europea enfrentó problemas de autenticación de sus productos cárnicos bovinos, los cuales presentaban la adición de carne de caballo. Después de este descubrimiento, la FSAI (*Food Safety Authority of Ireland*), junto al Departamento de Agricultura, Alimentos y Marina de Irlanda, implementaron una investigación en toda la cadena de producción y comercialización de los productos cárnicos de origen bovino que reveló el origen polaco de productos adulterados. La identificación de productos fraudulentos se extendió en toda la Unión Europea, alcanzando países como Inglaterra y Francia (*Department of Agriculture Food and the Marine*, 2013).

Como las etiquetas no proveen suficiente garantía sobre los contenidos reales de un producto, es necesario identificar y/o autenticar los componentes de los alimentos procesados, de modo de proteger tanto a consumidores como a productores de las sustituciones ilegales o de una identificación equivocada (Teletchea et al., 2005, Rastogi et al., 2007).

iii) La preocupación por las comunidades (principalmente hebreos y musulmanes) por el consumo de productos alimenticios adulterados o contaminados con carne de cerdo que, por cuestiones religiosas, no se consideran aceptables para su consumo (Mohamad et al., 2013). Lo

mismo sucede en el hinduismo, donde la vaca es considerada un animal sagrado y el consumo de su carne es tabú, siendo por lo tanto evitado por toda la comunidad hindú (Schröder, 2003).

iv) La existencia de individuos susceptibles a determinadas proteínas de origen animal, quienes suelen ser rigurosos con la elección de las especies a la hora de elegir alimentos con el objeto de evitar las alergias alimentarias.

v) La existencia de muestras encontradas en la escena del crimen que no dan resultados para los análisis estándares de DNA o microsátélites, permite plantearse si se está ante una muestra con ADN no apto para un análisis o si en realidad el ADN no pertenece a una persona. Si hubiera restos óseos que no son identificables morfológicamente, es posible confirmar la especie de origen por medio del ADN.

vi) La identificación de restos en el campo o en posesión de un sospechoso producto de la caza furtiva y la ayuda en la resolución de casos en la lucha contra de tráfico de especies en peligro de extinción (Fajardo et al., 2010). La identificación de especie de productos también se ha utilizado ampliamente en los que ya no es posible la identificación morfológica, como madera procesada (Finkeldey et al., 2010) y partes de animales (como los que se usan en la medicina tradicional china o las aletas de tiburón), que adquieren un elevado valor comercial en el mercado internacional (Ogden et al., 2009)

vii) La identificación de restos animales no humanos o especies vegetales utilizadas para la elaboración de utensilios, alimentación, rituales, etc. encontrados en sitios arqueológicos (Tillmar et al., 2013).

El concepto de “especie” es uno de los temas más debatidos de la biología evolutiva, hecho que se ve reflejado en la existencia de más de 20 definiciones basadas en diferentes métodos y criterios. La dificultad de asignar un organismo a una categoría biológicamente significativa debe ser considerada antes de usar cualquier herramienta de identificación molecular. Es importante el conocimiento de la historia evolutiva y la posición taxonómica del espécimen en estudio. Términos

como *cepa*, *variante*, *subespecie* o *raza* podrían, en algunas circunstancias, ser usados como sinónimos por diferentes investigadores para describir la misma entidad biológica (Pereira et al., 2008).

La identificación genética de especies se basa en el aislamiento y análisis de los marcadores de ADN que presentan variaciones entre especies pero son generalmente conservados dentro de la especie, ya que su tasa de mutación coincide aproximadamente con la tasa de evolución de las especies.

En animales, los marcadores más comúnmente usados son las regiones génicas dentro del ADNmt. El genoma mitocondrial, comparado con el genoma nuclear, es relativamente pequeño (en humanos 16.569 pb de ADN circular doble cadena). A diferencia del ADN nuclear, que consta de un set diploide por núcleo, existen por célula cientos a miles de copias del ADNmt. Esta abundancia permite hacer extracciones de ADN a partir de muestras altamente degradadas, procesadas o con relativamente muy poco material celular, muy comunes en genética forense animal, minimizando el riesgo de fallas al analizar este tipo de evidencia (Karlsson et al., 2007). Los haplotipos mitocondriales resultan de gran utilidad en la identificación de especies ya que no sufren recombinación y se heredan de forma uniparental. El resultado de esto es una diversidad intraespecífica reducida dado que las especies están aisladas reproductivamente y por lo tanto hacen que el ADNmt sea de utilidad para la identificación de especies. La tasa de mutación relativamente elevada, en comparación con los genes nucleares, resulta en la acumulación de mutaciones puntuales suficientes para la discriminación entre especies estrechamente relacionadas (Lockley y Bardsley, 2000). Para el gene COI, por ejemplo, la tasa de evolución molecular permite distinguir no sólo especies próximas sino también grupos filogeográficos dentro de una misma especie (Hebert et al., 2004; Hogg e Hebert, 2004; Ward et al., 2005).

Para los animales, se utiliza, en particular, el citocromo b (*Cytb*) (Parson et al., 2000; Bottero y Dalmasso, 2010; Dooley et al., 2004;

Sevillia *et al.*, 2007), la citocromo oxidasa I (COI) y la región control mitocondrial (D-loop) (Hebert *et al.*, 2003a y b). También se han usado marcadores mitocondriales adicionales que incluyen los genes que codifican para los ARN ribosomales (ARNr). Del mismo modo, se utilizan marcadores apropiados para plantas, normalmente localizados en el genoma de los cloroplastos, dentro de los genes *matK*, *rbcl* y *trnH-psbA* (Ogden *et al.*, 2009, ver capítulo 9).

El gen COI ha sido elegido para ser usado como código de barras en animales (Hebert *et al.*, 2003a) y las bases moleculares de secuencias de estas regiones están creciendo continuamente gracias al apoyo de museos de historia natural, investigadores de vida silvestre y otras instituciones, principalmente las relacionadas al consorcio CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*). El proyecto CBOL fue lanzado en mayo de 2004 y ya cuenta con más de 120 organizaciones de 45 países. CBOL tiene como objetivo promover o desarrollar alianzas internacionales de investigación necesarias para construir, a lo largo de los próximos 20 años, una biblioteca de códigos de barras para todas las especies eucarióticas (Ratnasingham e Hebert, 2007). La idea surgió en 2003, cuando investigadores de la Universidad de Guelph (Ontario, Canadá) propusieron la creación de un sistema diagnóstico universal de especies, basado en un fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), a partir de la base 58 del extremo 5' del gene mitocondrial COI. Este sistema fue denominado *DNA Barcode*, porque las secuencias de ADN de ese gen funcionarían como un código de barras (Hebert *et al.*, 2003). Posteriormente, se creó un banco genético de *DNA Barcode* para el depósito de la información de todas las especies que posean secuencias de COI publicadas, así como también especies que más tarde tendrán sus secuencias estudiadas. Para el análisis y el depósito de tales secuencias se utilizan muestras depositadas en museos u otras instituciones que previamente fueron identificadas por los taxonomistas (Ratnasingham e Hebert, 2007). Este banco de datos, denominado BOLD (*Barcode of Life Database*) permite asociar otros tipos de datos a

las muestras, tales como fotos de especímenes (*voucher*), punto de colecta, número de especímenes, institución en la cual ha sido depositado, datos taxonómicos e información molecular (electroferogramas de las secuencias y primers utilizados para la amplificación y secuenciación). El *DNA Barcode* es la técnica universal de identificación genética en peces y se usa en todo mundo, con por lo menos 7.705 especies ya analizadas (Fish-Bol, 2012). Recientemente, el organismo norteamericano FDA implementó el Barcode genético para la identificación de peces y sus productos para la certificación y detección de fraudes (Yancy et al., 2008). Iniciativas semejantes ya existen en otros países.

7.2. Identificación de especies

En la práctica existen varias técnicas que se usan para analizar marcadores informativos de especie. La mayoría de los métodos existentes para la determinación de especies se centra en muestras de ADN provenientes de una única especie y se basan en la amplificación por PCR. Sin embargo, hay muchas instancias donde no hay información *a priori* sobre las especies componentes de una muestra. En estos casos son de utilidad los métodos universales de tipificación, especialmente si el método permite detectar varias especies mezcladas en una muestra (Tillmar et al., 2013).

Uno de los principales métodos de identificación específica es la secuenciación de nucleótidos seguida de la comparación de la secuencia resultante con datos de secuencias de referencia de especies conocidas. El grado de similitud entre la secuencia a identificar y las de referencia permite inferir la especie de origen. La secuenciación de ADN ha sido aprobada por la ISFG y ha sido validada como técnica para uso en casos de identificación forense (Wilson et al., 1995).

El uso de *primers* universales, es decir *primers* que aparean en regiones altamente conservadas de un gen (regiones de secuencias que

son idénticas o prácticamente iguales entre las especies de un determinado taxón), permite amplificar el ADN de un rango amplio de especies sin contar con información previa acerca de la muestra. Estas secuencias conservadas flanquean regiones variables entre especies, lo que permite diferenciarlas por diferentes técnicas (Figura 7.1). Desde hace más de dos décadas se han descrito primers conservados como los propuestos por Kocher et al. (1989), que aún siguen siendo de utilidad en los análisis de identificación de especies.

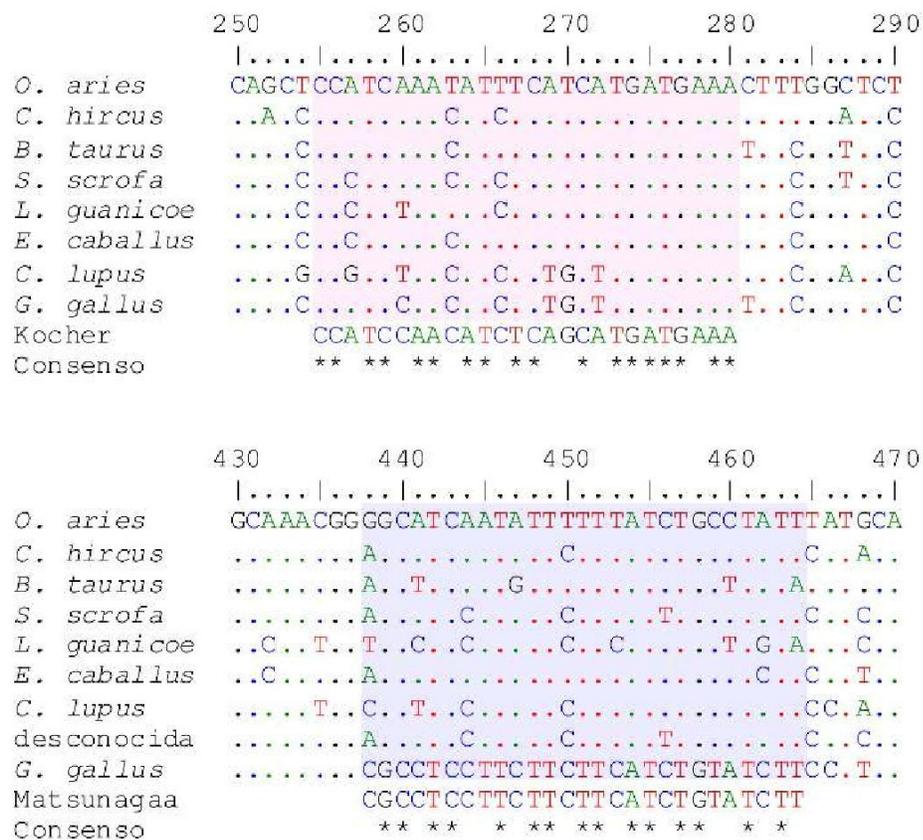


Figura 7.1: Primers universales de mamífero y primers específicos de especie. La figura representa el alineamiento de dos fragmentos de la secuencia del gen citocromo b de nueve especies de animales domésticos. Los números en la parte superior corresponden a la posición de los fragmentos dentro del gen. Los puntos representan identidad de nucleótidos con respecto a la secuencia de oveja (*O. aries*)

tomada como referencia. Los asteriscos representan posiciones en las que los nucleótidos están conservados en todas las secuencias analizadas. a) En el alineamiento de arriba se muestra uno de los primers universales de Kocher et al. (1989), que permite amplificar un fragmento del *cytb* de cualquiera especie de mamíferos. b) En el alineamiento de abajo se muestra uno de los primers específicos de pollo (*G. gallus*) publicado por Matsunaga et al. (1999). Este alineamiento también contiene un fragmento de una muestra desconocida que, por comparación con el resto de las secuencias, se puede identificar como perteneciente a cerdo (*S. scrofa*).

Una vez obtenida la secuencia, el método principal de identificación del ADN es por búsqueda y comparación de la secuencia desconocida con aquellas de especies conocidas almacenadas en una base de datos de referencia. Se calcula una medida de similitud entre secuencias y la muestra es asignada a la especie más semejante. Las bases de referencia más comúnmente usadas para búsquedas comparativas de identificación de especies son las bases de colaboración del NCBI/EMBL/DDBJ (www.insdc.org) y BOLD, parte del CBOL (www.barcodinglife.com). Para las especies que están bien representadas en dichas bases de datos, es común encontrar un 100% de coincidencias entre la muestra desconocida y las especies de referencia. Sin embargo, debido a las variaciones de secuencia entre especies, no siempre se observa una coincidencia completa, por lo que la identificación de la especie se logra con alrededor de un 98,5% de identidad. Especies muy relacionadas pueden tener una similitud del 90 al 95%, o incluso superior. Además, el largo de la secuencia a comparar afecta la confianza en la identificación. Es por eso, por lo tanto, que se deja en manos de la experiencia y opinión del científico forense la evaluación de la fuerza de una evidencia al abordar la tarea de asignar la especie a la que pertenece una secuencia (Ogden et al., 2009).

La secuenciación de ADN utiliza toda la información presente en la secuencia a analizar. Al realizar las comparaciones se observa que las

diferencias de marcadores genéticos a nivel de especies se deben principalmente a cambios de un único par de nucleótidos en sitios determinados de la secuencia de ADN, conocidos como SNPs (Figura 7.1).

Los SNPs pueden ser utilizados directamente para identificar especies evitando la necesidad de realizar la secuenciación completa y pueden ser caracterizados utilizando técnicas que requieren menos tecnología y/o son de menor costo, como el caso de la identificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR (RFLP) (Bravi et al., 2004; Stamoulis et al., 2010; Figura 7.2). Los análisis por PCR-RFLP también han sido ampliamente utilizados para la identificación de especies, debido a que con un único par de iniciadores se puede generar un fragmento que, con la elección apropiada de las enzimas de restricción, permite la discriminación de varias especies (Lockley y Bardsley, 2000). La reducción del tamaño de los marcadores genéticos analizados suele ser a menudo imprescindible para obtener resultados de muestras que están degradadas o han sido altamente procesadas en las que el ADN se encuentra fragmentado (Ogden et al., 2009). En este caso es posible el análisis de regiones más cortas de ADN por medio del genotipado de SNPs por pirosecuenciación o microarrays de SNPs (Ver 7.3).

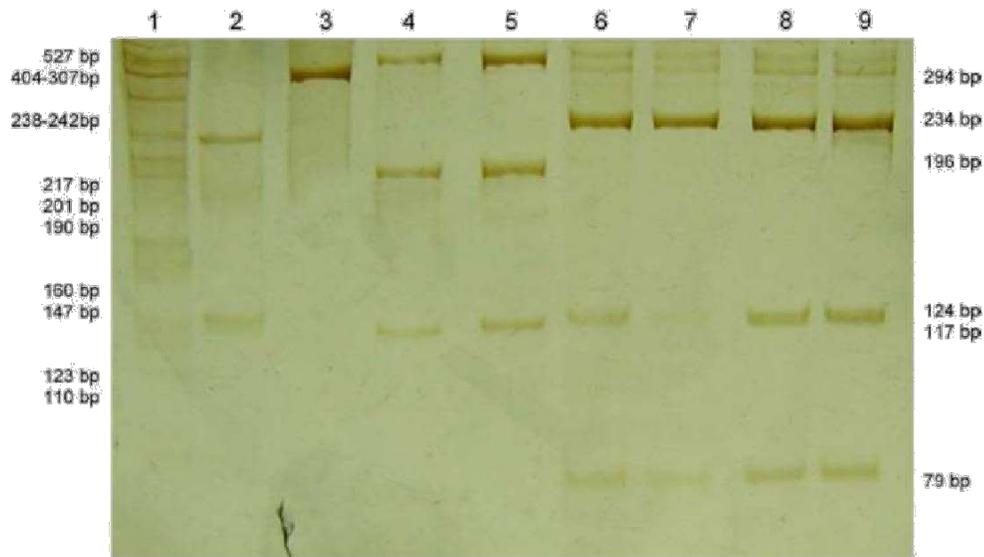


Figura 7.2: PCR-RFLP. Patrones de PCR-RFLP de un fragmento de amplificación por PCR del gen citocromo b (*Cytb*) obtenidos por digestión con la enzima *Hinf* I. Calle 1: marcador de peso molecular. Calle 2: conejo. Calle 3: oveja. Calle 4: bovino. Calle 5: muestra forense de bovino. Calle 6: caballo. Calles 7 a 9: muestras forenses de caballo. Los números de la izquierda representan los tamaños del marcador de peso molecular y los de la derecha los tamaños esperados de los fragmentos de digestión (Bravi et al., 2004).

El desarrollo de ensayos dirigidos a identificar SNPs permite el análisis de muestras en las que están presentes varias especies, cosa que no es posible hacer con la secuenciación de un fragmento amplificado con primers universales.

Un enfoque diferente se orienta a las áreas de secuencias diferenciales de cada especie. El beneficio de esta estrategia reside en la posibilidad de identificar una especie individual en una mezcla de dos o más especies. Esta identificación no es posible con el uso de la secuenciación. La Figura 1b muestra cómo es posible diseñar primers que hibridan solamente en una especie y difieren especialmente en el extremo 3' del cebador. En la Figura 7.3 se observa cómo es posible amplificar por PCR seis fragmentos de diferente tamaño, cada uno perteneciente a una especie, utilizando primers específicos de especie. Esta metodología ha permitido identificar un gran número de muestras

forenses de tráfico de especies, así como identificar diferentes componentes en alimentos (Matsunaga et al., 1999, Rasmussen et al., 2012, Doosti et al., 2014).

Asimismo, este tipo de diseño permite la realización de PCR múltiples (*multiplex PCR*) en las que, en una única reacción utilizando varios pares de primers, se pueden detectar simultáneamente varias especies en muestras de composición diversa (Matsunagaa et al., 1999; Tobe y Linacre, 2008).

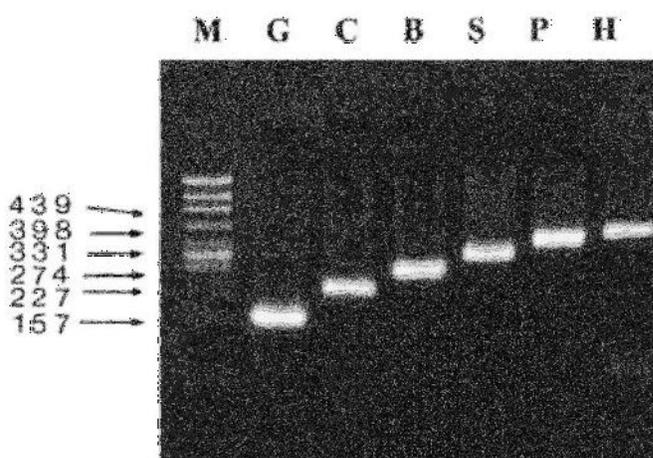


Figura 7.3: PCR con primers específicos de especie. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del ADN obtenido a partir de seis muestras de carne. G: cabra, C: pollo, B: bovino, S: oveja, P: cerdo y H: caballo. M: marcador de peso molecular (Matsunagaa et al., 1999).

Una alternativa al uso de primers específicos es usar primers universales en combinación con sondas específicas. Se diseñan diferentes sondas que hibridan con las secuencias de cada especie de modo que permitan ser detectadas por PCR en tiempo real (ver Capítulo 3.5). Esta tecnología es altamente específica y sensible, permitiendo además determinar el porcentaje de ADN de cada especie presente en una mezcla (Swamgo et al., 2006; Rojas et al., 2011; Soares et al., 2013; Drummond et al., 2013).

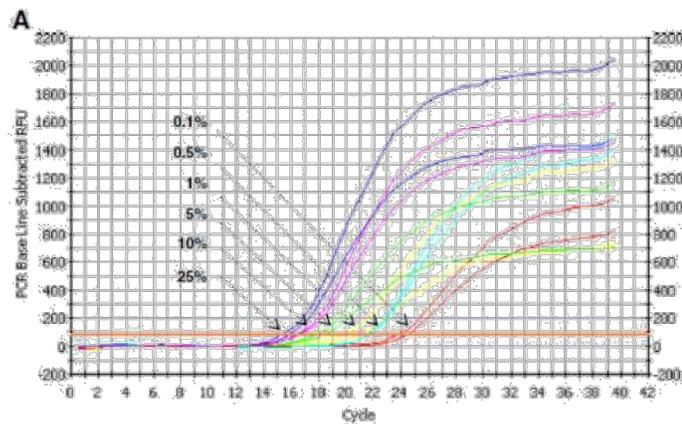
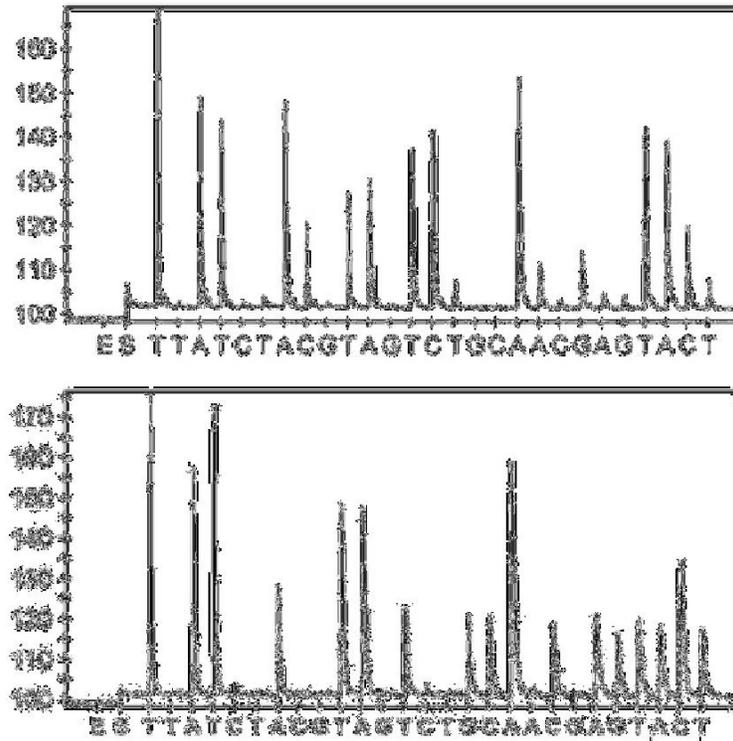


Figura 7.4: PCR en tiempo real. Curvas de amplificación por PCR en tiempo real de muestras de referencia de cerdo (0.1 al 25% de carne de cerdo en mezclas con carne de ave).

La identificación de SNP por pirosecuenciación permite la identificación de las posiciones variables en la secuencia de ADN entre especies distintas. Esta técnica se basa en la ocurrencia de una cascada de reacciones enzimáticas que producen la emisión de luz cada vez que se incorpora el nucleótido correcto en el extremo de una cadena de ADN que está creciendo. La incorporación de cada nucleótido se registra en un pirograma en el cual se puede leer la secuencia del ADN sintetizado. La altura de los picos de los pirogramas es proporcional al número de nucleótidos presentes en la secuencia (ver Capítulo 3.4). Focalizarse en un determinado SNP permite diseñar ensayos para la identificación de un número alto de muestras en forma rápida y económica y sin la necesidad de obtener fragmentos de ADN largos y de alta calidad (Balitzki-Korte et al., 2005; Karlsson y Holmlund, 2007).

En la Figura 7.5 se muestra cómo, por medio de la pirosecuenciación, se pueden identificar dos fragmentos pequeños de ADN obtenidos a partir de dos especies diferentes. Mediante esta técnica, Karlsson y Holmlund (2007) consiguieron identificar 28 especies de mamíferos en muestras desconocidas de fauna europea.

a)



b)

Cerdo (*Sus scrofa*) TTTAATTAAGTATTCCAAAAGTTAA
Humano (*Homo sapiens*) -----T-T--A-G----CAG--C

Figura 7.5: Identificación de especies por pirosecuenciación. a) Pirogramas de cerdo (arriba) y humano (abajo) de secuencias parciales del RNAr 16S. Las secuencias correspondientes se muestran en b). (Karlsson y Holmlund, 2007).

Con las nuevas tecnologías que utilizan microarreglos, conocidos comúnmente como chips de DNA, se puede realizar la detección simultánea de un número muy alto de SNPs de las especies a analizar. Los avances tecnológicos permiten vislumbrar que estos métodos estarán disponibles en un tiempo corto para su uso en la identificación masiva de alimentos y en el tráfico de fauna (Kochzius et al., 2008).

Al reducir la información genética disponible de una secuencia completa a varios SNPs dentro de un marcador genético, se aumenta el riesgo de una identificación equivocada de la muestra, que debe ser

tenida en cuenta al diseñar los ensayos y al interpretar los datos forenses. Tanto la PCR-RFLP como la identificación de SNP son métodos ampliamente aceptados en la comunidad forense; sin embargo, más que en la *identificación* de especies, son utilizados en la *detección* de las mismas.

La identificación de SNPs tiene un alcance definido por el total de especies analizadas durante el desarrollo de la técnica. La aplicación de este test asume el conocimiento de potenciales especies presentes con el objeto de distinguirlas, lo que no excluye la posibilidad de que se encuentre presente alguna otra especie distinta a la que se estaba buscando (Ogden et al., 2009).

7.3. Reporte de un caso

En el año 2012 se decomisaron 10 muestras de chorizos en diferentes comercios de una localidad de la Patagonia argentina. Las muestras se enviaron al IGEVET (UNLP-CONICET LA PLATA) con la solicitud de que se les realizara un análisis de identificación de especie. A partir del ADN de dichas muestras, utilizando primers universales, se amplificaron por PCR fragmentos de 358 pb correspondientes a una región del gen mitocondrial *cytb* (Kocher et al., 1989). Los fragmentos fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinf* I. Una de las muestras dio como resultado que en su composición había ADN de vaca y de caballo (Figura 7.6).

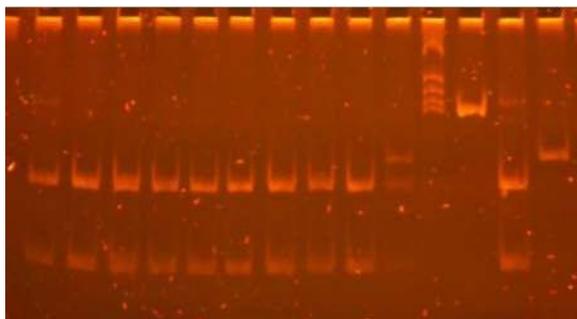


Figura 7.6: PCR-RFLP de muestras de chorizo decomisadas.

Electroforesis de los fragmentos del gen *cytb* de 358 pb amplificados por PCR y posteriormente digeridos con la enzima *Hinf* I. La digestión en bovinos genera dos fragmentos, uno de 196 pb y otro de 117 pb (calles 1 a 9, 13). En cerdos, este fragmento no posee sitio de corte para esta enzima (calle 12). En caballos, la digestión produce tres fragmentos, uno de 234 pb y otros dos de 79 y 45 pb, respectivamente (estos últimos no visibles en el gel) (calle 14). La muestra de la calle 10 muestra un patrón combinado de vaca y caballo.

Un nuevo envío de la misma entidad en 2013 constaba de 4 muestras: un trozo de carne, carne molida, un chorizo y un segundo trozo de carne, todos comercializados como de carne de vaca. Al realizar las amplificaciones con primers específicos, se pudo demostrar que los dos trozos de carne eran de caballo, la carne molida era de bovino y el chorizo era mezcla de carne de caballo y de vaca, no comprobándose la presencia de ADN de cerdo.

En la industria de los alimentos balanceados para bovinos es común utilizar la harina de pluma, subproducto de la industria avícola, como suplemento proteico. A la hora de exportar, el importador solicitaba la certificación de que la harina de pluma estuviera libre de materias primas de rumiantes (como por ejemplo, harina de hueso) con el objeto de evitar la transmisión de la encefalopatía esponjiforme bovina. Un análisis de ADN de la harina de plumas demostró que en su composición había únicamente ADN de pollo.

La duda sobre el origen de un pequeño hueso encontrado dentro de una morcilla que podría haber pertenecido a un roedor fue disipada rápidamente cuando posteriormente a un tratamiento de descalcificación

se extrajo ADN del tejido y se pudo comprobar que su secuencia tenía un 99% de similitud con la secuencia del gen *Cytb* de *Sus scrofa* (cerdo) (Figura 7.7).



Figura 7.7: Hueso encontrado dentro de una morcilla. El tamaño y la forma del mismo generó la sospecha que perteneciera a alguna especie desconocida. El análisis de ADN por secuenciación demostró que provenía de un cerdo.

En una carrera de caballos, el dopaje en la orina dio positivo. El dueño afirmaba que la orina había sido sustituida ya que estaba seguro de que su caballo no había recibido ninguna droga no permitida. Con el objeto de determinar si la orina cuestionada pertenecía o no al caballo, se tomaron muestras de sangre y pelo del caballo y se les realizó la extracción de ADN para determinar la identidad por medio de microsatélites y compararlos con los que se obtendrían de la orina. Utilizando esta técnica se pudieron determinar los microsatélites de la sangre y el pelo, pero la orina dio resultados negativos.

Al tratar de determinar si a partir de la orina se había podido obtener ADN con cierta integridad y libre de inhibidores, se probó sobre esta muestra la amplificación de un fragmento del gen mitocondrial *Cytb*. Se pudo obtener un producto de amplificación que al ser analizado posteriormente por secuenciación y por PCR-RFLP dio como resultado que no pertenecía a la especie equina. La comparación con el banco de datos GenBank dio un 100% de identidad con humano. Se obtuvo el

mismo resultado por la comparación de los patrones de digestión de la PCR-RFLP. Los resultados evidenciaron una manipulación de la muestra, en la que se sustituyó la orina de caballo por la de una persona, dando soporte a la hipótesis del criador del caballo sospechado de dopaje (Díaz et al., 2008; Figura 7.8).

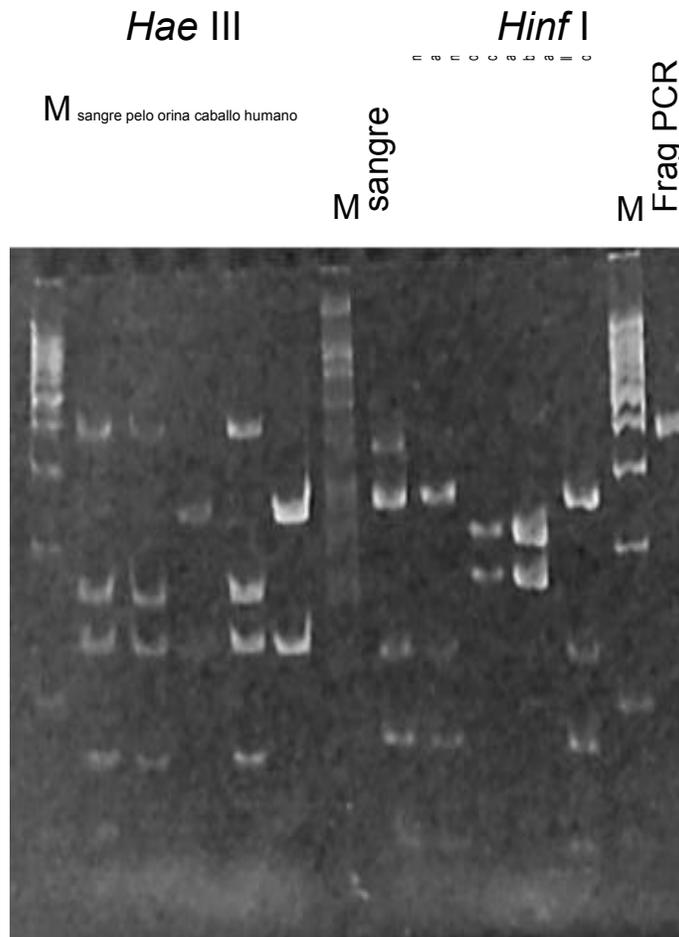


Figura 7.8: Patrón de PCR-RFLP de la orina de caballo sospechada de doping. A la izquierda, patrón de digestión con la enzima *Hae* III de las muestras de sangre y pelo del caballo cuestionado, de la orina y de controles de caballo y humano. El patrón de restricción de la orina coincide con el de humano. A la derecha se muestra el patrón de restricción con la enzima *Hinf* I de las mismas muestras. Aquí también, el patrón de la orina coincide con el de humano. M: marcador de peso molecular. FragPCR: fragmento de amplificación por PCR sin digerir.

La posible sustitución de un producto por otro de menor valor comercial y la sensibilidad a las proteínas de la leche de vaca motivaron el pedido de identificación de especie a la que pertenecía la leche con que se elaboró un queso comercializado como puro de cabra. El producto generó una fuerte reacción en un consumidor alérgico quien demandó al fabricante por adulterar el producto. Al tratar de identificar la especie con la que fue elaborado se encontró que la digestión del fragmento del gen mitocondrial *cytb* con dos enzimas de restricción mostró patrones coincidentes con aquellos producto de la combinación de los patrones de vaca y cabra, confirmándose la adulteración del queso.

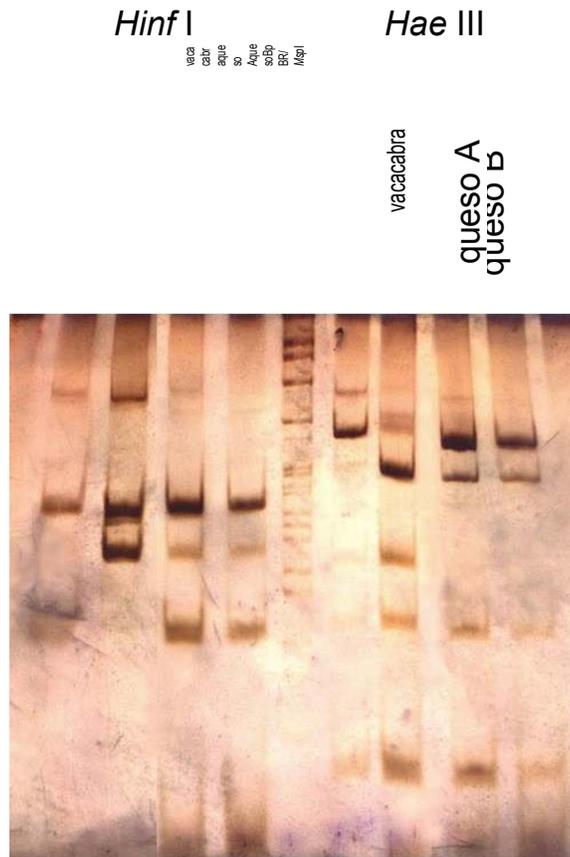


Figura 7.9: Patrón de PCR-RFLP de un queso cuestionado por adulteración. A la izquierda, patrón de digestión con la enzima *Hinf I* de controles de vaca, cabra y de dos extracciones diferentes del queso cuestionado. A la derecha, patrón de digestión con la enzima *Hae III* de las mismas muestras. En ambos casos se ve en el queso la superposición de patrones de cabra y vaca.

Durante los años 2009 y 2010 se realizó una investigación utilizando *DNA Barcode* para certificar la autenticidad de pescados comercializados como surubí en supermercados de la ciudad de Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). De acuerdo con el banco de datos *Fish Base* (www.fishbase.org), algunas especies, entre ellas *Pseudoplatystoma corruscans*, pueden ser comercializadas con el nombre común de surubí. La muestra estaba dividida en dos grupos, 30 muestras de peces enteros y 33 muestras de filetes. En el grupo de pescado entero, el 97% de las muestras fueron identificadas como *Pseudoplatystoma tigrinum*, una especie del mismo género, pero se encuentra en otra cuenca nacional y no es considerada como surubí por la *Fish Base*. Por el contrario, sólo el 42% de las muestras de filetes pertenecía al género *Pseudoplatystoma*. Además, presentaban una mayor similitud con otros géneros, entre ellos *Brachyplatystoma*, *Netuma* y *Genidens*. No se encontró ninguna muestra de *Pseudoplatystoma corruscans*, o surubí verdadero (Carvalho et al., 2011).

7.4. Referencias Bibliográficas

Balitzki-Korte B.; Anslinger K.; Bartsch C; Rolf B. (2005). Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. *Int J Legal Med* 119: 291-294.

Bottero MT., Dalmasso A. (2010). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *Vet J.*, 190, 34-38.

Carvalho, D.C.C., Pimenta-Neto, D.A., Brasil, B.S.A.F. & Oliveira, D.A.A., 2011. DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(Suppl 1), pp 97-105.

Díaz S., Kienast E., Villegas-Castagnasso E., Pena N., Manganare M., Posik D., Peral-García P., Giovambattista G. (2008) Substitution of Human for Horse Urine Disproves an Accusation of Doping. *J Forensic Sci*, Vol. 53, No. 5.

Department of Agriculture Food and the Marine, 2013. Equine DNA & Mislabelling of Processed Beef Investigation - Report March, 2013.

Doosti A., Ghasemi Dehkordi P., Rahimi E. (2014) Molecular assay to fraud identification of meat products. *J Food Sci Technol*. 51(1):148-52. doi: 10.1007/s13197-011-0456-3.

Drummond, M.G., Brasil, B.S.A.F., Dalsecco, L.S., Brasil, R.S.A.F., Teixeira L.V., Oliveira, D.A.A., 2013. A Versatile Real-Time PCR Method to Quantify Bovine Contamination in Buffalo Products. *Food Control*, 29, pp.131–137.

Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431–438.

Karlsson A. y Holmlund G. (2007) Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International*. 173:16– 20.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug; 86(16):6196-200.

Fajardo V, González I, Rojas M, García T, Martín R. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 2010,21:408-42.

Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O. Molecular genetics tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Feb;85(5):1251-8.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003a) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 270(Suppl 1):96–99.

Hebert PDN, Cywinska A Ball SL and deWaard JR (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R. Soc Lond Ser B Biol Sci* 270:313–321

Hebert, P.D.N.; Penton, E. H.; Burns, J. M.; et al. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. n.101, p. 14812-14817.

Hedlin P, Taschuk R, Potter A, Griebel P, Napper S. Detection and control of prion diseases in food animals. *ISRN Vet Sci*. 2012 Feb 29; 2012:254739. doi:10.5402/2012/254739.

Hogg, ID; Hebert, PDN. (2004) Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*. v.82, p.749-754.

Karlsson A., Holmlund G. (2007). Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International* 173:16–20.

Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: methods and protocols. *Methods Mol Bio*. 2012;858:3-8.

Lockley A., Bardsley R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci. Technol.*, v.11, 67–77.

Matsunagaa T., Chikuni K., Tanabeb R., Muroyab S., Shibata K., Yamadaa J., Shinmuraa Y. (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science* 51:143-148

Mohamad NA., El Sheikha AF., Mustafa S, Khairil Mokhtar NF. (2013) Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review. *Food Research International* 50:330–338.

Ogden R, Dawnay N, McEwing R. (2009) Wildlife DNA forensics-bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*. 9:179-195.

- Pereira F, Carneiro J, Amorim A. (2008) Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2:187-200.
- Rasmussen Hellberg RS, Morrissey MT, Hanner RH. (2010) A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. *J Food Sci*. 75(7):C595-606.
- Rastogi G., Dharne M, Walujkar S., Kumar A., Patole M, Shouche Y. (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* 76:666–674.
- Ratnasingham, S.; Hebert, P. D. N. BOLD: The barcode of life data system www.barcodinglife.org. *Molecular Ecology Notes*, n. 7, p. 355–364, 2007.
- Rojas M., González I., Pavón MA., Pegels N., Hernández PE., García T, Martín R. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control* 22: 523-531.
- Sevilla RG., Diez A., Noren ., Mouchel., Jerome M., Verrez-Bagnis V., Van Pelt H., Favre Krey L., Krey G., Bautista J. (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*. 7(5):730-734.
- Soares S., Amaral JS., Oliveira MB., Mafra I. (2013) A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science* 94:115–120.
- Stamoulis P., Stamatis C., Sarafidou T., Mamuris Z. (2010) Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control* 21:1061–1065.
- Swango K., Timken M., Chong MD., Buoncristiani MR. (2006) A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International* 158:14–26.

Tillmar AO, Dell'Amico B, Welander J, Holmlund G (2013) A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. *PLoS ONE* 8(12): e83761. doi:10.1371/journal.pone.0083761.

Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; et al. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, v. 360(1462): 1847-1857.

Wilson MR, Dizinno JA, Polansky D, Replogle J, Budowle B. (1995) Validation of mitochondrial-DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 108:68–74.

Yancy, H.F.; Zemlak, T.S.; Mason, J.A.; et al. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the regulatory fish encyclopedia. *J Food Prot.* v.71, p.210-217, 2008.

CAPÍTULO 8

IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA EN TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE

PROBLEMÁTICAS QUE LLEVAN A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES
SILVESTRES: TRÁFICO DE FAUNA, ADULTERACIÓN DE ALIMENTOS
CON PRODUCTOS SILVESTRES, MEDICINA TRADICIONAL.

María Eugenia D'Amato

8.1. Introducción

En este capítulo presentaremos la problemática de la identificación de *especies e individuos* de especies silvestres. Esta necesidad surge de los requerimientos para asegurar la protección de la biodiversidad, la explotación sustentable de los recursos naturales y la bioseguridad (transporte de patógenos, cuarentenas), entre otros. Se presenta brevemente la situación contextual mundial en forense de fauna, un breve historial de los avances tecnológicos que permiten la práctica de esta disciplina, los avances en análisis genético de datos más importantes y casos emblemáticos de los continentes africano y asiático en la identificación de productos de origen animal.

8.2. El contexto forense: Protección de la biodiversidad

La genética forense de fauna (y flora) es una disciplina relativamente nueva, la cual está íntimamente ligada a la investigación científica para la conservación de especies. Mediante la aplicación de técnicas de genética forense tradicional es posible:

La identificación de especies.

La identificación de la región geográfica o grupo de origen.

La identificación de trazas de material biológico de especies protegidas en situaciones de tráfico o caza ilegal.

Si bien las técnicas de laboratorio son idénticas a las utilizadas en genética forense humana, el análisis posterior de la información genética requiere de un entrenamiento muy específico en análisis filogenético, estadística y genética de poblaciones. Algunos ejemplos de estos casos se encuentran en la sección 8.7. “Problemas específicos de la práctica forense de vida silvestre”.

Sin embargo, la identificación genética es casi el último eslabón de la cadena de acontecimientos en forense de fauna silvestre: para que ello suceda es necesario contar con un marco legal que defina qué especies están protegidas del comercio, el tráfico y la explotación, y de instituciones u organizaciones estatales que aseguren el cumplimiento de la ley, con una clara definición de las consecuencias de su infracción. La instancia de prosecución y los pasos posteriores a la identificación de una actividad criminal se excluye de este capítulo y se presentan sólo algunos casos a nivel informativo.

El estado de vulnerabilidad de especies animales y vegetales es definido individualmente por estados y países independientes y por organizaciones o tratados internacionales, como la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*, <http://www.iucn.org>) y CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, www.cites.org), respectivamente.

CITES es un acuerdo internacional firmado originalmente por 80 estados en 1973 y que actualmente cuenta con 178 estados signatarios.

La función de este tratado es asegurar la supervivencia de especies silvestres afectadas por el tráfico internacional. CITES determina las especies para las cuales es necesario contar con una licencia para su importación o exportación. Los estados signatarios definen, dentro de su sistema legal, el organismo que extiende las licencias y nombra asesores científicos a tal propósito.

De acuerdo al grado de vulnerabilidad de las especies, CITES define 3 niveles de protección en los apéndices I, II y III, los cuales son listas de organismos en nivel decreciente de vulnerabilidad.

Apéndice I: incluye especies amenazadas de extinción. El comercio de estas especies se permite en forma excepcional.

Apéndice II: incluye especies no necesariamente amenazadas de extinción, pero su comercio debe ser controlado para asegurar su supervivencia

Apéndice III: incluye especies protegidas en al menos 1 país.

IUCN es una organización sin fines de lucro fundada en 1948, compuesta por más de 1.200 miembros. Entre ellos figuran estados, oficinas gubernamentales y organizaciones no gubernamentales (ONGs) nacionales e internacionales que desarrollan programas de educación, desarrollo sustentable, conservación, políticas globales y aspectos legales relacionados con la conservación de la naturaleza.

Esta organización definió 7 categorías de vulnerabilidad de especies silvestres: de última preocupación (*least concern*), casi amenazadas (*near threatened*), vulnerables (*vulnerable*), en peligro (*endangered*), en estado crítico (*critically endangered*), extinta en estado salvaje (*extinct in the wild*) y extinta (*extinct*) (<http://www.iucnredlist.org/>). Estas categorías son utilizadas para el planeamiento de la conservación de especies, el monitoreo y la toma de decisiones.

Los problemas ambientales y relacionados con tráfico o explotación de especies silvestres muchas veces exceden los límites geográficos nacionales y se requiere la acción coordinada de organismos supranacionales que aseguren la protección de especies y el

cumplimiento de la legislación internacional. La red internacional de mayor envergadura es la ASEAN-WEN (*Association of Southeast Asian Nations Wildlife Enforcement Network*, <http://www.asean-wen.org/>) que nuclea aduanas, cuerpos de policía y diversas agencias gubernamentales y ambientales de 10 países (Brunéi, Camboya, Indonesia, Laos, Malasia, Myanmar, Filipinas, Singapur, Vietnam y Tailandia). Nueva Zelandia y Australia acordaron otra organización internacional, AELERT (*Australasian Environmental Law Enforcement and Regulations Network*), que nuclea diversas agencias locales, estatales y federales con el fin de coordinar acciones que aseguren la protección del medio ambiente. Una organización similar se creó en 2011 en Centroamérica, ROAVIS (*Red de Observancia y Aplicación de la Normativa de Vida Silvestre de Centro América y República Dominicana*). Esta organización coordina las acciones de protección contra el tráfico de fauna entre Sudamérica y Norteamérica y cuenta con financiación del Departamento de Estado de Estados Unidos. Los estados componentes de ROAVIS son Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y República Dominicana. ROAVIS es avalada por la ONG internacional TRAFFIC (<http://worldwildlife.org/initiatives/traffic-the-wildlife-trade-monitoring-network>) la cual es subsidiaria o una iniciativa dependiente del WWF (*World Wildlife Fund*, www.wwf.org)

Otras ONGs y organizaciones internacionales especializadas en forense de vida silvestre se especializan en la diseminación de conocimiento, coordinación de actividades, construcción de capacidad operativa y obtención de fondos para determinados proyectos de desarrollo forense. Por ejemplo, TRACE (*Tools and Resources for Applied Conservation and Enforcement*, <http://www.tracenetwork.org>), fundada en 2006.

El organismo internacional de mayor alcance y prestigio en la acción coordinada contra el crimen internacional es Interpol. Interpol es una organización internacional que cumple la función de coordinar acciones

contra el crimen internacional organizado y adquirir y compartir información de importancia para combatir crímenes de diversa índole. Esta agencia cuenta con un Programa de Crimen Ambiental, con secciones especializadas en vida silvestre, polución y pesca. También coordina el entrenamiento coordinado de personal de seguridad de distintos países con problemas comunes, como el tráfico de fauna en África.

Las organizaciones nacionales involucradas en la prevención del tráfico y explotación ilegal de fauna son generalmente las fuerzas policiales y de parques nacionales. Como la genética forense de fauna es una disciplina relativamente nueva, hay pocos países que cuentan con laboratorios estatales especializados en esta disciplina y los análisis son generalmente derivados a grupos de investigación especializados pertenecientes a universidades, museos de ciencias naturales, institutos de investigación, o zoológicos.

Entre las organizaciones nacionales más activas figuran PAW (*Partnership for Actions Against Wildlife Crime*) en Gran Bretaña, (<http://www.defra.gov.uk/paw/about/>), destinada a implementar y efectivizar las leyes de protección del medio ambiente y de la vida silvestre y de la cual participan miembros de organizaciones gubernamentales y no gubernamentales.

En Estados Unidos, dos organizaciones gubernamentales se ocupan de implementar el cumplimiento de leyes para distintos sectores de ambiente y vida silvestre. El Servicio de Vida Salvaje y Pesca de EE.UU (USFWS, *United States Fish and Wildlife Service*) cuenta con un organismo especializado que se encarga de hacer cumplir la ley (*United States Fish and Wildlife Service Office of Law Enforcement*). El gobierno de EE.UU. también cuenta con un laboratorio especializado y dedicado solamente a forense de vida silvestre (*Fish & Wildlife Service Forensics Laboratory*) en Ashlan, Oregon (<http://www.fws.gov/lab/>). La política y las implementaciones gubernamentales en contra del tráfico de fauna en EE.UU pueden verse en Wyler y Sheik (2013).

La Sociedad para la Ciencia Forense de Vida Silvestre (*Society for Wildlife Forensic Science*, www.wildlifeforensicscience.org/) fue creada en enero de 2011, con 52 laboratorios miembros de los Estados Unidos, Canadá, Brasil, Australia, Nueva Zelandia, Gran Bretaña, Suecia, Suiza, India, Malasia, Hong-Kong, Tailandia y Sudáfrica. Mediante una iniciativa de esta sociedad se creó, en forma análoga al SWGDAM (*Scientific Working Group for DNA Analysis Methods*) para genética forense humana en EE.UU y también en 2011, el Grupo Científico de Trabajo para las Ciencias Forenses de Vida Silvestre (SWGWILD, *Scientific Working Group for Wildlife Forensic Sciences*) encargado de delinear recomendaciones de prácticas a seguir en procedimientos de forense de vida silvestre. Se puede acceder a estas recomendaciones en el sitio <http://www.wildlifeforensicscience.org/swqwild/>.

8.3. Tráfico de fauna: crimen de escala global

Las regiones más afectadas por el tráfico internacional de fauna son África y Asia. Las mismas cuentan con una enorme riqueza de biodiversidad, pero son también de las más pobres del planeta. El tráfico internacional de especies y productos animales de alto valor está normalmente ligado a otras organizaciones criminales, también internacionales, que facilitan el tráfico de drogas o armas y la presencia de milicias organizadas en países con inestabilidad política, que aprovechan la disponibilidad de especies de gran valor en el mercado ilícito para solventar sus actividades (Warchol et al., 2004; Milliken y Shaw, 2012; CITES, IUCN & TRAFFIC, 2013).

El reporte de WWF (Dalberg, 2012) indica que el tráfico de vida silvestre y sus productos, excluyendo pesquerías y maderas, ocupa el cuarto lugar de comercio ilícito en el mundo, después del tráfico de narcóticos, falsificaciones y tráfico humano, con un marco que excede los 10 mil millones⁽²⁾ de USD anuales.

La pobreza y las costumbres locales también implican una amenaza para la fauna local. Un reporte del Parlamento de Gran Bretaña sobre el “comercio de carne del monte” (*bushmeat trade*) en la cuenca de Congo indica que el tráfico de animales para este fin alcanza las 3,4 millones de toneladas por año, mientras que en la cuenca del Amazonas los volúmenes de tráfico no llegan a un 5% de este valor (PostNote, 2005). Una revisión más reciente y detallada, avalada por TRAFFIC (www.traffic.org), presenta los valores de volumen de caza y precios en el mercado de “carne del monte” en África (Lindsay et al., 2012). El tráfico de aves y reptiles es también un comercio de gran envergadura en Sudáfrica y Namibia, con destino a ser utilizados como mascotas (Warchol et al., 2003).

8.4. Breve historia de la genética forense

8.4.1. Los avances tecnológicos

El desarrollo de la genética forense de especies salvajes (o especies no-modelo) está íntimamente asociado al desarrollo de los estudios poblacionales y evolutivos de estas especies. Son precisamente estos trabajos los que posibilitaron contar con secuencias de ADN de referencia. Hubo dos hitos importantes en el desarrollo de tecnologías que permitieron un incremento exponencial no solamente en genética forense sino en la disponibilidad pública de secuencias de ADN. El primero fue el desarrollo del método de PCR (Saiki et al., 1985, 1988), trabajo que le valió a Kary Mullis el premio Nobel de Química en 1993. La reacción de PCR tuvo un enorme impacto en las ciencias biológicas y biomédicas. La posibilidad de obtener una gran cantidad de producto (secuencias de ADN) también facilitó la combinación de la reacción de PCR con el método de secuenciación de ADN mediante la utilización de dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). En 1989, el equipo de Allan Wilson⁽¹⁾ de la Universidad de California en Berkeley, EE.UU, publicó los primeros

primers universales para diversos genes mitocondriales (Kocher et al., 1989). Estos hechos dieron un enorme impulso al estudio de organismos no-modelo y permitió el avance de estudios filogenéticos y poblacionales de un gran espectro de organismos eucariotas y procariotas. El incremento exponencial de la disponibilidad de secuencias de los genes mitocondriales citocromo b (cyt b) se muestra en la Figura 8.1. La creciente disponibilidad de una gran cantidad de información genética de referencia facilitó el desarrollo de la genética forense faunística (Hsieh et al., 2001; Hsieh et al., 2003).

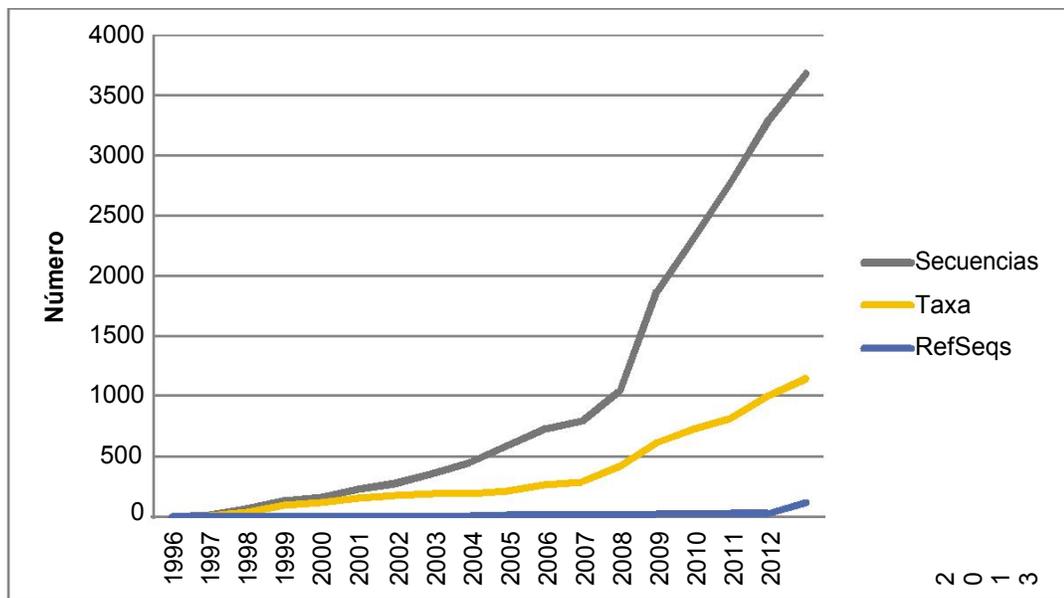


Figura 8.1: Ejemplo de la creciente disponibilidad de secuencias mitocondriales de animales en GenBank. Se muestran el número de secuencias disponibles para “Bovidae” y “cytb”, el número de taxa y el número de genomas mitocondriales completos elegidos como referencia para la base de datos RefSeq and NCBI.

A mediados de la década del 80 nacen los métodos modernos de identificación genética de individuos. La primera investigación forense resuelta por polimorfismos de ADN fue conducida por el profesor Sir Alec Jeffreys, quien resolvió un problema de inmigración de un niño de Ghana, probando la relación de parentesco con su madre y hermanos

residentes en Gran Bretaña (Jeffreys et al., 1985b). La técnica que desarrolló fue denominada “huellas digitales genéticas” (*DNA fingerprinting*) y utilizaba sondas marcadas radioactivamente para detectar fragmentos de ADN genómico cortado con enzimas de restricción y transferido a un soporte sólido, como membranas de nitrocelulosa. Las sondas representaban motivos repetidos que aparecían dispersos en el genoma en organizaciones en tándem de cientos de pares de bases. La utilización de esta técnica de identificación de polimorfismos de repeticiones (minisatélites, Jeffreys et al. 1985a) dominó la genética forense hasta principios de los '90. Esta técnica de las huellas genéticas también se usó en otros organismos en estudios poblacionales, identificación de líneas, cepas, pedigríes, entre otros.

En la década del '90, los marcadores que toman la delantera en la identificación de individuos son los microsátélites, marcadores que dominaron la genética forense humana desde entonces. Estos son de enorme utilidad en estudios evolutivos, genética de poblaciones y estudios genealógicos (Goldsstein y Schlotterer, 1999).

En identificación de especies, los SNPs adquieren mayor relevancia. A partir de trabajos originales como los de Bartlett y Williamson (1992) se desarrollaron innumerables métodos específicos de detección de especies a partir de material biológico. Los métodos modernos varían desde la utilización de primers especie-específicos para la generación de productos de PCR de tamaño específico, a la utilización de métodos automatizados de detección de SNPs (Ogden et al., 2009).

El último gran hito tecnológico es el desarrollo de tecnologías genómicas de secuenciación clonal, conocidas como secuenciación de próxima generación (NGS) (Mardis, 2013). Esta tecnología es particularmente útil para el estudio de material de origen mixto o mezclas de productos de distintas fuentes y fue utilizada en la investigación de la identidad de productos medicinales tradicionales asiáticos (ver sección

Casuística). Ogden, en su revisión de 2011, detalla la potencialidad y diversidad de estas técnicas en forense de vida silvestre.

8.4.2. Una necesidad imperiosa: las bases de datos

En todo sistema de identificación genética es necesario contar con un sistema de referencia. Así como la identificación de individuos en genética forense humana requiere del conocimiento de las frecuencias alélicas o haplotípicas poblacionales, en la identificación de especies es necesario tener un sistema de referencia apropiado, tanto para la identificación de especies como de individuos. En la sección anterior se indicaron los eventos científicos que permitieron el incremento de la información disponible. En esta sección se presentan las bases de datos de secuencias de ADN que permiten el acceso a esta información.

Las dos bases de datos de mayor impacto (utilización) son GenBank y BOLD. Estas difieren en alcance e interés. El NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) de EE.UU contiene diversas bases de datos genéticos y genómicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/all/#databases>), entre ellas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), creada en 1982. Esta base de datos es depositaria de secuencias completas de genomas de diversas especies (especie humana, especies domésticas y varios microorganismos), diversas secuencias completas o parciales de genes nucleares o mitocondriales y genomas mitocondriales completos de diversas especies silvestres. Estas secuencias son enviadas directamente a la base de datos, sin intención de publicación posterior, o forman parte de trabajos publicados en revistas científicas internacionales con revisión por pares previo a su publicación. Muchas editoriales exigen la disponibilidad pública de las secuencias utilizadas en los estudios filogenéticos o poblacionales como condición *sine qua non* (*Wiley Scientific Publications*, <http://www.wiley.com/WileyCDA/>) para la publicación de trabajos científicos. GenBank es el mayor repositorio mundial de secuencias de ADN. Sin embargo, no está exento de errores

ya que no cuenta con controles de calidad de interpretación de electroferogramas y secuencias, como es la norma en bases de datos genéticas humanas de aplicación forense como EMPOP (empop.org). Otras fuentes de error son las identificaciones erróneas de especies y posiblemente el error humano y la confusión de muestras durante el procesamiento de información en los laboratorios. Ejemplos de identificación de depósitos erróneos en GenBank se pueden encontrar en Harkins et al. (2006), Teletchea et al. (2008), Linacre and Tobe (2011), D'Amato et al. (2013).

La base de datos BOLD es más reciente. Fundada en 2003, es depositaria de un fragmento de 648 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad 1 (COI). Este fragmento, de gran utilidad para la identificación de especies, fue denominado “código de barras de la vida” (*barcoding of life*, Hebert et al., 2003; Ratnasingham y Hebert, 2007). La información enviada a esta base de datos debe estar acompañada de información sobre el “voucher” de origen, institución de origen e información biológica adicional. Las secuencias depositadas en BOLD se encuentran también disponibles en GenBank, pero la situación inversa no se cumple. No todas las secuencias de COI en GenBank cumplen con las condiciones de aceptación para BOLD.

8.5. La problemática más frecuente en la práctica forense de vida silvestre

Las técnicas mencionadas en esta sección tuvieron un gran impacto científico que excedió el campo de la genética forense humana. Si bien la organización y estandarización de la genética forense de vida silvestre fue un poco más tardía (ver sección siguiente), contó con la ventaja de utilizar la experiencia adquirida en la práctica forense humana para la obtención de datos.

Sin embargo, el tipo de marcadores a utilizar depende del tipo de pregunta que se intenta responder. A diferencia de la genética forense humana, que generalmente requiere de un análisis de parentesco, la práctica de genética forense de especies silvestres suele requerir de análisis filogenético o de la identificación del grupo, stock, linaje o variante geográfica al cual un determinado individuo pertenece. Los procedimientos generales de práctica de laboratorio y de análisis de datos se detallan a continuación.

8.6. Los procedimientos estándar

En forma similar a la práctica de genética forense humana, la práctica de genética forense animal debe seguir protocolos de trabajo que aseguren la calidad (*quality assurance*) de los resultados y definan controles de calidad de los procedimientos utilizados. Budowle et al. (2005) describen la necesidad de establecer prácticas de laboratorio que reduzcan la posibilidad de contaminación y aseguren la calidad de los resultados, como el testeado de reactivos con anterioridad al análisis de muestras, la utilización de controles negativos durante la extracción del ADN y de la preparación de la reacción de PCR, y la calibración y el monitoreo regular de la precisión de instrumentos. Los procedimientos experimentales de laboratorio deben estar adecuadamente validados, es decir, se deben conocer los límites de sensibilidad, reproducibilidad, exactitud, precisión y los parámetros experimentales dentro de los cuales se obtienen perfiles genéticos similares (Para más detalles, ver el capítulo 10).

Los procedimientos estándar de operación (SOP, *standard operating procedures*) deben establecer claramente qué criterios se utilizaron para la denominación de alelos de microsatélites, basados exclusivamente en el número de repeticiones presentes en el fragmento amplificado por PCR. Una nomenclatura claramente expresada permite la comparación de datos entre laboratorios. En la denominación de secuencias de ADN

mitocondrial, los sitios polimórficos son expresados utilizando genomas mitocondriales de referencia, por ejemplo los presentes en la sección RefSeq de GenBank (<http://ftp.cbi.pku.edu.cn/pub/database/RefSeq/release/mitochondrion/?C=D;O=A>) gato (NC_001700), pollo (NC_001323), vaca (NC_001567), perro (NC_002008), cabra (NC_005044), caballo (NC_001640), cerdo (NC_000845) y oveja (NC_001941) y para especies salvajes de ciervo (NC_004563), oso (NC_003426), salmón (NC_001960), y esturión (NC_004420); o bien genomas mitocondriales adoptados como referencia por la comunidad científica por su temprana fecha de publicación (genoma de *Bos taurus* V00654, Anderson et al., 1982).

Sin embargo, en un reporte forense, una identificación *ad hoc* no es válida y las conclusiones del análisis deben estar acompañadas de valores numéricos o analíticos que las avalen. A continuación se presentan los procedimientos más frecuente de comparación de secuencias, grado de similitud entre secuencias y parámetros evaluados en búsquedas en bases de datos y evaluación de similitud por métodos filogenéticos, conjuntamente con sus ventajas, problemas y limitaciones.

8.7. Problemas específicos de la práctica forense de vida silvestre

8.7.1. Especies. Delimitación e identificación de especies

Una de las situaciones más frecuentes en la práctica de genética forense de vida silvestre es la identificación de especies protegidas en productos de origen animal o en trazas de material biológico en ropas y utensilios de cazadores ilegales. Esta situación nos retrotrae a la pregunta posiblemente más fundamental en biología: ¿Qué es una especie? No es la intención de este capítulo resumir la problemática de la delimitación de especies, sino presentar los problemas enfrentados en forma práctica y cómo reportar la identificación específica. En definitiva,

la práctica taxonómica muchas veces es reducida al criterio personal del investigador, resumido en la frase “una especie biológica es lo que un taxónomo entiende como tal”⁽³⁾.

Los pasos fundamentales en la identificación forense de especies son los siguientes:

1. Elección de una secuencia de ADN a estudiar.
2. Obtención de información genética del espécimen, muestra, producto de origen animal o vegetal, mancha, provista por autoridades pertinentes para el análisis.
3. Comparación del resultado con secuencias de referencia.
4. Validación de la correspondencia (*match*).

El primer paso en la identificación de especies es la *elección de un fragmento de ADN* que sea altamente informativo. Esta condición está dada por el grado de polimorfismo inter-específico de dicho gen y la cantidad de información disponible como referencia en las bases de datos. Históricamente, los fragmentos de ADN que dominaron esta práctica son los genes mitocondriales *cyt b* y *COI*. De las 1140 bases de *cyt b* generalmente se utiliza una región de aproximadamente 360 del pb, mientras que de las 1544 bases de *COI* se utiliza un fragmento de aproximadamente 600 pb. El debate sobre cuál es más adecuado para la identificación de especies fue extensamente cubierto por la literatura científica. El trabajo de Tobe et al. (2011) indica que la señal filogenética de *cyt b* es mayor que la de *COI*.

El diseño experimental se basa entonces en la secuencia de ADN informativa a estudiar. La extracción de ADN es seguida de una reacción de PCR utilizando primers universales y/ o especie-específicos, seguidos de una reacción de secuenciación, utilizando el método de Sanger de terminación por dideoxinucleótidos.

El siguiente paso es la comparación del resultado obtenido con otras secuencias de referencia. La práctica más recomendable es la obtención de estas referencias en el laboratorio forense utilizando material

conocido provisto por especialistas que certifiquen la identidad taxonómica de las muestras (*vouchers* de BioBanks, zoológicos o museos). La utilización de referencias existentes en bases de datos es la práctica más frecuente, por ejemplo, la exploración directa de GenBank y BOLD.

La función “BLAST search” en GenBank permite determinar cuáles son las secuencias más similares a la de estudio y que están presentes en la base de datos. El resultado de GenBank BLAST es una lista de secuencias ordenadas de mayor a menor similitud con respecto a la secuencia en estudio. Los parámetros que permiten evaluar el grado de similitud son el “bit-score” (score máximo y total), E-value, porcentaje de identidad y grado de cobertura. El último es un valor muy intuitivo; es el grado de solapamiento entre la secuencia en estudio y otras existentes en la base de datos. Una cobertura del 50% indica que la secuencia en estudio es superpuesta o cubierta sólo en la mitad de su extensión por otra existente en la base de datos. La calidad del alineamiento entre la secuencia en estudio y las existentes en la base de datos está dada por los valores de “bit score” (cuanto mayor el valor, más confiable es el alineamiento) y un valor estadístico de la probabilidad de que una similitud de ese tipo ocurra por azar está dada por el E-value. Cuanto más bajo el E-value, menor es la posibilidad de una correspondencia (*match*) por azar. Por ejemplo, un valor de $E=0,01$ indica que existe una probabilidad en 100 de que esa correspondencia ocurra por azar. Estos valores deben ser adecuadamente evaluados, ya que una base de datos deficiente en determinados taxa puede dar valores altos de score, que no son necesariamente las más próximas en sentido filogenético.

Durante el estudio de la identidad específica de charqui (*biltong*) en Sudáfrica (D’Amato et al., 2013), la especie con máximo bit-score (756) para una secuencia de COI (acceso a GenBank JX567041) resultó *Lagorchestes hirsutus*, canguro liebre (hare-wallaby), una pequeña especie de Macropodidae. El resultado mostró un 100% de cobertura, un E-value de 0,0 (0 probabilidad de un match de este tipo por azar) y una

identidad del 88%. La misma muestra fue secuenciada para *cytb* (acceso a GenBank JX567196). Esta vez la especie con máximo bit-score (586) y 100% de cobertura fue el canguro rojo *Macropus rufus*, el *Macropodidae* de mayor tamaño, con un E-value de 10^{-158} . Estos resultados indican la escasez de secuencias de COI para especies de *Macropodidae* en el GenBank.

La inspección de match en el GenBank es una primera aproximación, que debe ser validada por otros métodos. Las bases de datos presentan limitaciones y, como se demostró arriba, la representatividad de taxa y genes suele ser limitada. La inspección de las distancias genéticas intra- e inter-específicas fue sugerida por el trabajo de Tobe et al. (2010). Estos autores investigaron los rangos de distancia genética intra- e inter-específica para *cyt b* y COI utilizando datos de 236 especies de mamíferos. Para ello utilizaron la distancia de Kimura de 2 parámetros multiplicada por 100 [K2P (x100)] (Kimura-2-Parameter-Model; Kimura, 1980). Este es un modelo de sustitución nucleotídica que considera diferente ritmo de sustitución para transiciones y transversiones. Estos autores observaron que las diferencias intra- e inter-específicas mostraban valores de K2P (x100) menores que 1,5 % y mayores que 2,5%, respectivamente.

Estos valores deberían considerarse cuidadosamente en un análisis forense. Especies con una importante estructura genética poblacional o que hayan sufrido una importante deriva génica pueden mostrar valores intra-específicos superiores al 2% de similitud genética. En el otro extremo se encuentran las especies con historias evolutivas muy recientes, como los ñus o los Équidos, con importantes eventos de especiación en el Pleistoceno. En el estudio de D'Amato et al. (2013) mencionado anteriormente, la evaluación de toda la información disponible para especies detectadas en *biltong* encontró valores intra-específicos de hasta un 10% de divergencia entre especies de jirafas y valores menores que 2,5% de divergencia entre el ñu azul y el ñu negro. Los valores encontrados por Tobe et al. (2010) son una buena guía

inicial, pero es altamente recomendable realizar una evaluación exhaustiva de toda la información disponible para la/s especie/s en estudio, utilizando otros métodos, como el análisis filogenético.

El análisis filogenético tiene la ventaja de poder identificar grupos de secuencias en agrupamientos jerárquicos de mayor a menor similitud. Los métodos filogenéticos permiten obtener valores estadísticos que apoyen la credibilidad de estos grupos. Los métodos de máxima parsimonia, máxima probabilidad (maximum likelihood) y distancia (neighbor joining) utilizan un reemplazo (bootstrap) de nucleótidos y con estas nuevas secuencias con algunos nucleótidos reemplazados se vuelve a reconstruir la filogenia un determinado número de veces. La proporción de veces que las ramas del árbol son recuperadas en forma idéntica al árbol original es el valor de *bootstrap*, el cual es presentado en el nodo. En general se acepta 95% o mayor como valores confiables de topología. Valores menores que 50% en general no se muestran por su bajo nivel de confiabilidad. Yang y Rannala han publicado recientemente una revisión de métodos moleculares filogenéticos (2012).

Los resultados de una reconstrucción filogenética deben ser también evaluados cuidadosamente. Un elevado valor de *bootstrap* en los nodos indica que estas secuencias están emparentadas pero no necesariamente indica identidad específica. Se requiere una evaluación de la distancia genética entre los componentes de un grupo, clado o rama.

Una limitación inherente de los marcadores uniparentales es, precisamente, su carácter de uniparental. Las secuencias mitocondriales pierden calidad de información para casos de hibridación e introgresión. En el estudio de identidad de especies utilizadas para manufacturar *biltong*, se evaluaron referencias provistas por especialistas, secuencias presentes en GenBank y secuencias encontradas en la carne durante el estudio. Las especies de ñu entraron en contacto secundario por acción antropogénica en Sudáfrica. Parte del material de referencia provisto por

los especialistas no correspondía a la especie esperada de ñu, lo que refleja un grado de introgresión importante después del cual no es posible identificar híbridos, que adquieren el fenotipo de la especie en la que lo absorbe genéticamente.

8.7.2. Determinación del origen geográfico de los especímenes.

Asignación

El análisis de la distribución geográfica de la diversidad genética en una especie es una necesidad prioritaria en el diseño de unidades de conservación. El término filogeografía fue acuñado por Avise y colaboradores en 1987 (Avise et al., 1987), originado del análisis de distribución geográfica de linajes mitocondriales dentro de una especie. Esta concepción permitió el desarrollo del concepto de UES (Unidades Evolutivas Significativas; Moritz, 1994).

Entre las secuencias mitocondriales más utilizadas en filogeografía y estudios intra-específicos figuran *cyt b* y *D-loop*. El último muestra un ritmo de mutación 10 veces mayor al observado en las secuencias mitocondriales codificantes y similar al de los microsatélites.

Durante el análisis de *biltong* en D'Amato et al. (2013) una de las especies identificadas fue la cebrá Cape Mountain, incluida en el apéndice II de CITES. El análisis filogenético con *cyt b* sugiere que la carne de este espécimen provenía de Namibia y no de Sudáfrica.

En los últimos 14 años se han publicado y perfeccionado métodos de asignación de individuos a poblaciones mediante el uso de marcadores diploides. Los primeros intentos estuvieron basados en la utilización de frecuencias alélicas existentes en grupos predeterminados o conocidos (Petkau et al., 1995; Eichert y Banks, 2000) para determinar la probabilidad de un genotipo de pertenecer a ellos. Cornuet et al. (1999), basados en Rannala y Mountain (1997), desarrollaron un método bayesiano parcial en el que mediante simulaciones de Monte Carlo se generan genotipos de poblaciones parentales previo a la asignación del

genotipo de interés. Estos métodos se hallan implementados en el programa GenClass (Piri et al., 2004) y representan métodos supervisados de clasificación en los que los grupos de asignación son predeterminados o conocidos por el investigador. Más recientemente, Wesser et al. (2004) elaboraron un método de inferencia de frecuencias alélicas en regiones geográficas no muestreadas, partiendo de datos genotípicos y distribución geográfica de los mismos. Así, es posible la asignación de muestras de origen desconocido a regiones geográficas de las cuales no se cuenta con información. Este método tiene una ventaja sobre los mencionados más arriba, en los que las asignaciones se encuentran limitadas a muestras conocidas; el mismo fue utilizado en la inferencia de la zona de origen de marfil africano confiscado (ver sección Casuística 8.8).

Todos estos métodos asumen equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento (LE). La utilidad y limitaciones de estos métodos de asignación fueron evaluadas por Manel et al. (2002) y Ball et al. (2011) con ejemplos de datos publicados para estudios de genética de poblaciones y estudios forenses. (Para más detalle sobre los métodos de asignación, ver capítulo 6).

8.7.3. Identificación de individuos

Los procedimientos en la identificación de individuos son básicamente idénticos a los utilizados en estudios de determinación de parentesco (filiación) en humanos. Los marcadores genéticos utilizados son las secuencias mitocondriales de la región control o D-loop y los microsatélites especie-específicos. Revisiones de estos procedimientos se encuentran publicadas en Evett y Weir (1998) y Fung y Hu (2008). Un ejemplo de estos procedimientos se puede ver en la identificación de una tigresa matada en el Tiger Safari Zoo Park en la India en el año 2000, sólo para obtener sus garras. Unos 4 años más tarde se realizó un análisis de filiación entre las garras del tigre encontradas en posesión de

un sospechoso y los padres y hermanos del animal matado, habitante del mismo zoológico. Los análisis dieron una identificación positiva del parentesco esperado entre el material secuestrado al sospechoso y los tigres del zoológico (Gupta et al., 2011).

8.8. Casuística forense de vida silvestre

8.8.1. Caza ilegal de rinocerontes en África

La expansión económica en Asia determinó un mayor poder adquisitivo de sus habitantes. Desafortunadamente este hecho afectó en forma dramática la situación de supervivencia de muchas especies utilizadas en medicina tradicional y consumo humano. Los cuernos de rinoceronte tienen un enorme valor económico en la medicina tradicional del sudeste asiático y China por sus supuestas propiedades afrodisíacas: 1 kg de cuerno alcanza valores de USD 30.000 en el mercado ilegal. El rinoceronte de Java se extinguió en Vietnam en el año 2011. De esta especie sólo quedan unas pocas decenas de animales en Java e Indonesia. Al disminuir las poblaciones asiáticas, la atención se desvió hacia África, con la consecuente dilapidación de las poblaciones naturales en ese continente. CITES prohibió el comercio de rinocerontes africanos y sus productos en 1977. Sudáfrica está habitada por 2 especies de rinoceronte, el negro (*Diceros bicornis*) y el blanco (*Ceratotherium simum*) (Figura 8.2). La población de rinocerontes blancos fue reducida a unos 40 individuos a principios del siglo XX y actualmente los aproximadamente 20.000 animales que se encuentran en reservas nacionales y privadas de Sudáfrica descienden de esta población remanente. El 90% de los rinocerontes blancos y el 40% (de un total de 5.000 individuos) de los negros se encuentran en Sudáfrica

. La caza ilegal es llevada a cabo por sindicatos internacionales organizados, que cuentan con una importante logística para la localización de las presas, el transporte y el armamento.



Figura 8.2: Hembra de rinoceronte blanco con su cuerno cortado como medida preventiva de caza ilegal en el Parque Nacional Kruger. Foto cortesía Carla D'Amato.

Sudáfrica presenta el 85% de los 25.000 rinocerontes en estado silvestre en el planeta. En Sudáfrica, la depredación se realiza tanto en parques nacionales como en tierras privadas, pero la peor parte es sufrida por el Parque Nacional Kruger. Este Parque forma parte del Great Limpopo Transfrontier Park – conjuntamente con el Gonarezhou National Park en Zimbabwe y el Limpopo National Park en Mozambique – que en forma conjunta alcanzan una extensión de 35.000 km². El parque Kruger tiene una extensión de casi 20 millones de hectáreas (19.485 km²), una superficie equivalente al tamaño de Israel, Gales o la provincia de Tucumán. Esta extensión es de muy difícil monitoreo, por lo que está fácilmente expuesto al crimen organizado ingresante desde países limítrofes (ver 3). La estrategia adoptada por parques nacionales y propietarios de reservas privadas es el corte de cuernos de los animales para evitar que sean asesinados. Esta práctica no siempre es exitosa, ya que la caza continúa aún con el propósito de extraer la base

remanente de los cuernos removidos. La última estrategia adoptada por el Parque Nacional Kruger es la utilización de drones para monitoreo y locación de cazadores ilegales. La estadística de caza ilegal estimada por el Departamento de Asuntos Ambientales de Sudáfrica se muestra en la Figura 8.3. Los valores del año 2013 fueron recolectados en septiembre. Aproximadamente un 60% de esta depredación tiene lugar en el Parque Nacional Kruger.

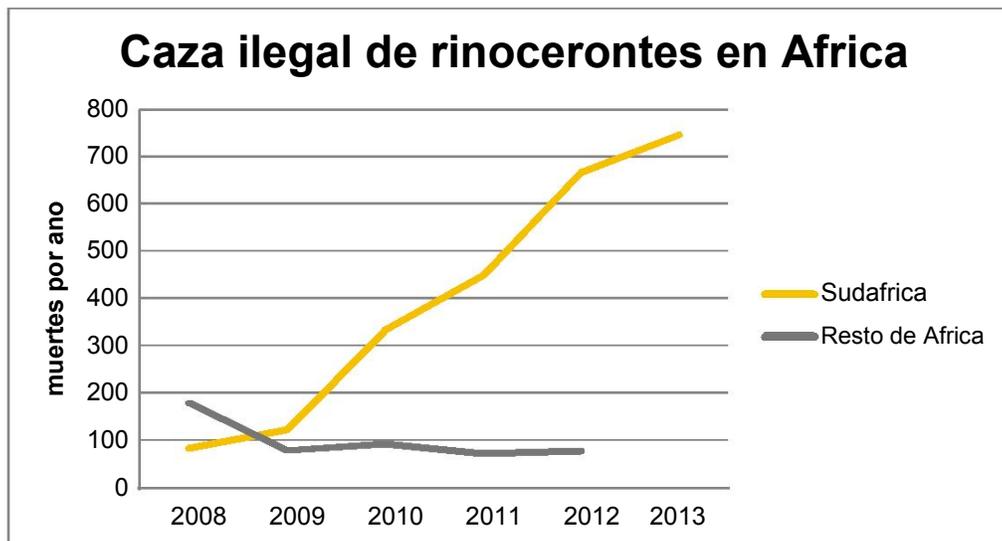


Figura 8.3: Numero de rinocerontes cazados anualmente en Sudáfrica y África debido al comercio ilegal de cuernos. Los valores continentales para 2013 corresponden al mes de febrero.

La Universidad de Pretoria desarrolló un sistema de identificación de individuos patentado como Rhodis®, Rhino DNA Index System. El proyecto Rhodis® tiene como objetivo la generación de una base de datos de perfiles de individuos en todas las reservas nacionales, provinciales y privadas; permite la trazabilidad de cuernos confiscados de manos de traficantes y se los puede adjudicar a individuos (cadáveres) específicos.

El sistema consiste de 22 loci de microsatélites y un sistema de sexado (Harper et al., 2013) y permite distinguir las dos especies. Aplicando una corrección por endocria de $\Theta = 0,3$ la probabilidad de

coincidencia aleatoria (RMP, *random match probability*) para el rinoceronte blanco es $1,7 \times 10^{-5} - 6 \times 10^{-6}$. Los valores exceden el número existente de individuos de esta especie. Esta base de datos cuenta actualmente con unos 3.500 perfiles individuales de ambas especies.

El Laboratorio de Genética Veterinaria de la Universidad de Pretoria y el Servicio de Policía de Sudáfrica desarrollaron en forma conjunta un kit para la recolección de material biológico de rinocerontes para estandarizar el muestreo y asegurar la cadena de custodia en casos forenses. Hacia fines de 2012, el sistema de identificación genética permitió el arresto de unos 400 cazadores ilegales y el encarcelamiento de 25⁽⁴⁾.

8.8.2. Caza ilegal de elefantes en África

El elefante africano *Loxodonta africana* fue cazado en forma intensiva debido al precio del marfil. En 1989 CITES promueve la veda total de la explotación de elefantes africanos y el tráfico de marfil: el elefante africano es enlistado en el Apéndice I de CITES. Sin embargo, los países de África del sur Namibia, Botswana, Zimbabwe y Sudáfrica transfirieron a esta especie al Apéndice II entre 1997-2000. Actualmente, las regiones más afectadas por la caza ilegal de elefantes son África central y occidental (recopilado en UNEP, CITES, IUCN, TRAFFIC, 2013). En 1997 CITES establece MIKE (*Monitoring the Illegal Killing of Elephants*) y TRAFFIC establece el programa ETIS (*Elephant Trade Information System Database*) como programas de recolección de información de caza ilegal de elefantes y el estudio de la ruta de contrabando y recolección de datos de confiscaciones. La ruta de tráfico ilegal y contrabando involucra más frecuentemente a países del sudeste asiático y China (CITES report SC61). Se estima que las matanzas en todo el continente en 2012 y 2013 alcanzaron los 25.000 y 22.000 ejemplares, respectivamente (CITES, IUCN, TRAFFIC, 2013).

El número remanente de animales de esta especie en estado salvaje es de aproximadamente 470.000 en todo el continente (Blanc et al., 2007). Recientemente se reconoció el estatus de especies diferentes, de modo tal que las dos formas conocidas, el elefante de bosque y el de sabana, sean especies diferentes, *Loxodonta africana cyclotis* y *Loxodonta africana africana* (Figura 4), actualmente *L. africana* y *L. cyclotis*, respectivamente (Rohland et al., 2010). Ambas son consideradas “vulnerables” por la IUCN.



Figura 8.4. *Loxodonta africana africana*. Kruger National Park.
Foto cortesía Malena D’Amato

Wasser et al. (2004) realizaron un estudio genético para evaluar la distribución geográfica de la variabilidad genética en elefantes africanos y así poder predecir el origen geográfico a partir de muestras de colmillos y marfil de origen desconocido. Partiendo de muestras de tejidos y escatológicas colectadas en 28 localidades, realizaron una tarea de genotipado con 16 microsatélites especie-específicos. Estos

autores desarrollaron un método de emparejado espacial de frecuencias alélicas (*spatial-smoothing based estimates of allele frequencies*) que permite la asignación de muestras de origen desconocido a regiones geográficas de las que no hay material de referencia. Este método, denominado de asignación continuo (CAM, *continuous assignment method*), es más efectivo que los métodos tradicionales de asignación como el de Paetkau et al. (1995). Estos autores utilizaron sus métodos de asignación para analizar muestras confiscadas de contrabando de marfil. Uno de estos episodios fue la confiscación de 6,5 toneladas de marfil ocurrida en Singapur en 2002. El análisis de las muestras indicó que los colmillos provenían del elefante de sabana, de una región geográfica del sur de África circunscripta a Zambia, cercano a Malawi, lugar desde donde partió la carga marítima a oriente (Wesser et al., 2007). Un estudio subsiguiente realizado sobre una confiscación de la cadena de tráfico Camerún-Hong-Kong asignó el material estudiado al elefante de bosque, con origen geográfico en el sur de Gabón (Wesser et al., 2008). El material confiscado de ambas cadenas mostró una asignación geográfica similar, evidenciando así una organización internacional del comercio ilícito mediante múltiples puntos de embarque para material proveniente de una zona de explotación. Estos estudios permitieron evidenciar países y zonas de explotación intensiva donde se reforzaron los esfuerzos en contra de la cacería ilegal. Los estudios de ADN del material confiscado permitieron de esta manera incrementar la información sobre las rutas de cacería y contrabando del marfil en África.

8.8.3. Pesca ilegal de abalón en Sudáfrica

El abalón *Haliotis midae* o perlemoen (Figura 8.5) es un gastrópodo intermareal de la familia Haliotidae, endémico de Sudáfrica; es el haliótido de mayor porte presente en el territorio Sudafricano. Esta especie es blanco de pesca ilegal debido al elevado precio que alcanza en el mercado asiático: unos U\$S 300 por kilogramo de carne sin valva.

La explotación ilegal del abalon se encuentra íntimamente ligada a factores socioeconómicos en Sudáfrica, y la ruta internacional del comercio ilícito de esta especie está coordinada con el tráfico de sustancias abusivas ilegales desde China mediante la actuación de organizaciones criminales internacionales (Steinberg, 2005).

H. midae es una especie de crecimiento lento, alcanzando la madurez sexual a la edad de 8-9 años y un tamaño de 20 cm a la edad de 30 años. En el año 2010 el gobierno sudafricano tomó la controvertida decisión de retirar a esta especie del Apéndice III de CITES.

Los pescadores ilegales devalvan los abalones y cuando son interrogados por autoridades o patrullajes costeros aseguran haber pescado otra especie intermareal de menor tamaño, el siffie *Haliotis spadicea*. El tamaño legal de pesca del abalon es 114 mm, limitado a unos pocos individuos por buzo mediante la obtención de un permiso específico.

Sweijd et al. (1998) diseñaron un ensayo para distinguir a estas dos especies mediante el análisis de la secuencia de ADN del gel “sperm lysin”, que presenta un alto grado de conservación intra-específico (Vacquier et al., 1990). El test consiste en una amplificación por PCR de un fragmento de 130 pb de este gen, seguido de RFLP o bien secuenciación por método de Sanger. Una transición determina la ausencia de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Hha* III en el siffie (GCAC) mientras que la secuencia GCGC del abalon es reconocida y clivada. Los productos de PCR son resueltos en geles de agarosa. Este test se realiza desde el año 2002 en la Universidad de Stellenbosch (Roodt-Wilding y Bester, 2006) donde regularmente se analiza el material biológico confiscado, hisopados de instrumentos y material utilizado en la recolección de abalon como guantes y cuchillos. *H. midae* es detectado en una cifra superior al 75% de los casos así estudiados (Bester, comunicación personal).



Figura 8.5: Ejemplares juveniles de *Haliotis midae*. Fotografía cortesía de A. Bester, Universidad de Stellenbosch.

8.8.4. Tráfico ilegal de chitas en el sur del continente africano

El chita (*Acinonyx jubatus*) tenía una amplia distribución geográfica en los continentes africano y asiático. Actualmente, es considerada una especie vulnerable por IUCN y está incluida en el Apéndice I de CITES. La mayor población africana se encuentra en Namibia, con aproximadamente 2.500 animales. El tráfico de esta especie está limitado a un número anual de 5 animales vivos o como trofeos de caza para Botswana, 150 para Namibia y 50 para Zimbabwe. En Sudáfrica, el chita está presente en la lista de especies que necesitan protección en el *National Environmental Management: Biodiversity Act, 2004* (Acta N° 10 de 2004). La posesión o transporte de especies protegidas necesita de un permiso emitido por autoridades nacionales y provinciales.

En 2008, un estudio realizado por la *Universidad del Free State* (Kotze *et al.*, 2008) detectó el origen extra nacional de unos 6 chitas encontrados en una estancia lindera con Botswana. Esta es una zona afectada por el tráfico de vida silvestre. Los dueños de la estancia no poseían los permisos necesarios y las autoridades de control delegaron

el estudio del origen de estos animales. Como referencia se utilizó ADN de un total de 57 animales provenientes de Botswana, Namibia y Sudáfrica. Analizaron el polimorfismo de 13 microsatélites aislados en gato doméstico y los 11 loci que no mostraron desvíos de HWE se utilizaron en el análisis de asignación. Estos autores aplicaron tres métodos: un método basado en frecuencias génicas, un método bayesiano parcial y un método bayesiano completo. El método basado en frecuencias génicas de Paetkau (1995) asignó 5 de los 6 animales a Namibia y uno no pudo ser asignado a ningún grupo. La utilización del test de exclusión de Rannala y Mountain (1997) en combinación con el método bayesiano parcial de Cornuet et al. (1999) asignó 4 animales a Namibia, mientras que 2 animales no pudieron ser asignados. Estos dos procedimientos se encuentran implementados en el programa GENECLASS 2 (Piry et al. 2004). El programa STRUCTURE se utilizó en forma relajada, admitiendo mezcla [admixture] y correlación en la frecuencia de alelos. Este procedimiento es más realista que los parámetros utilizados por Manel et al. (2002). Los 3 grupos (clusters) identificados en este análisis mostraron una diferente proporción de distribución de los especímenes de referencia entre ellos y una mayor similitud de 2 de los animales en estudio con especímenes de Namibia, tres con el grupo representado mayoritariamente por animales sudafricanos y uno con el grupo representado mayoritariamente por los animales de referencia de Botswana. Estos resultados indican que la hipótesis del origen de Botswana de los seis chitas debe descartarse. Históricamente muchas de las poblaciones de chitas de Sudáfrica provienen de translocaciones realizadas desde Namibia.

8.9. Identificación de especies en productos comestibles de origen animal en Sudáfrica

En los países de Sudáfrica, es muy popular el consumo de carne seca con especias, un tipo de charqui llamado localmente *biltong* (Figura 8.6) y salchichas secas (*droë wors*). Estos productos son manufacturados

por productores locales a pequeña escala o bien a gran escala, y cuentan con marcas comerciales. Si bien se manufacturan con carne de vaca, los productos más populares provienen de carne de antílopes locales, cazados a tal propósito o explotados como ganadería, o de carne de avestruz, única especie nativa que se cría en forma intensiva.



Figura 8.6: Canasta abierta de *biltong* en un negocio especializado en este producto.

Un estudio reciente (D'Amato et al. 2013) evaluó la identidad y veracidad de la etiquetas comerciales de unas 146 muestras de carne procesada como *biltong*, salchichas secas, carpaccio, carne fresca y ahumada en el mercado de Sudáfrica. Las muestras fueron analizadas mediante secuenciación de productos de PCR utilizando primers para *cyt b* y *COI*. El análisis de identificación de especies se realizó de manera exhaustiva mediante diferentes métodos como BLAST en Genbank, análisis filogenético, análisis de asignación por caracteres diagnósticos y análisis de distancia genética intra- e inter-específica. Quedaron así evidenciados los problemas y las ventajas de estos métodos en la investigación de identificación de especies, y los riesgos de basar las conclusiones de asignación a un solo método.

El resultado de esta investigación (Figura 8.7) demostró que el 69,2% de los productos contenía material distinto al de la etiqueta comercial, de los cuales 42% correspondía a *Bos taurus*, mientras que una proporción

similar pertenecía a otra especie salvaje. Entre ellas se detectó la cebra de montaña *Equus zebra zebra* (Figura 8.8), catalogada en el Apéndice II de CITES. En menor proporción se detectaron las especies domésticas *Ovis aries*, *Equus caballus* y *Sus scrofa* y 3 especies de canguro.

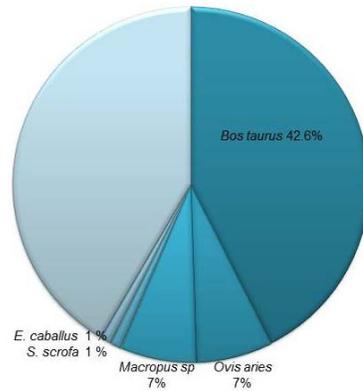


Figura 8.7: Proporción de la contribución específica a los productos de carne “salvaje” substituidos en el mercado sudafricano.



Figura 8.8: Cebra de montaña *Equus zebra zebra*, encontrada en *biltong*.

8.10. Aplicación de pirosecuenciación en la identificación de especies a partir de material biológico altamente procesado

Las nuevas tecnologías genómicas basadas en pirosecuenciación y producción de una gran cantidad de datos simultáneamente (*High Throughput*) produjeron un enorme impacto no sólo en los estudios genómicos sino también en otras disciplinas, como la genética forense. Estos métodos de secuenciación de próxima generación (NGS) y de segunda generación permiten la identificación de una gran cantidad individual de hebras de ADN originadas a partir de un solo evento de PCR (reseñadas en Glenn, 2011). Este tipo de secuenciación clonal (cada hebra es considerada un “clon”) es posible gracias a plataformas como Illumina MySeq (Illumina), 454 GS Junior (Roche) y Ion Torrent (Life Technologies).

Un trabajo realizado en la Universidad de Perth, Australia, evidenció la composición compleja de productos de medicina tradicional china (Coghlan et al., 2012) compuestos por materiales biológicos altamente procesados, en forma de jarabes, píldoras o pulverizados. Esta situación determina la imposibilidad de aplicar los métodos tradicionales de PCR y secuenciación para la investigación exhaustiva de la composición del producto, salvo que se desee investigar la presencia de ciertas especies con primers de PCR altamente específicos. Para evitar este inconveniente, el grupo de Michael Bunce aplicó primers de PCR universales para blancos de origen vegetal y animal: la región del p-loop del gen plastídico *trnL*, y el gen 16S rRNA mitocondrial. Los productos de PCR fueron secuenciados y analizados en la plataforma 454-Junior (Roche) (ver Rothberg y Leamon, 2008, para mayor detalle). Se leyeron aproximadamente 49.000 secuencias totales que partieron de 15 muestras de productos de medicina tradicional china detenidas por oficiales aduaneros en el momento de entrada a Australia. El resultado del estudio mostró la presencia de 68 familias de plantas, algunas potencialmente tóxicas como *Ephedra* y *Asarum*; dos especies de animales catalogadas por IUCN como vulnerable y en estado

crítico, respectivamente: el oso negro asiático (*Ursus thibetanus*) y la saiga (*Saiga tatarica*), mientras que el 78% de los productos contenía especies no declaradas.

8.11. Material y lecturas adicionales

John E. Cooper and Margaret E. Cooper (eds.): Wildlife forensic investigation—principles and practice. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2013, ISBN: 978-1-4398-1374-4

Jane E. Huffman, John R. Wallace (eds) : Wildlife Forensics: Methods and Applications. Wiley & Sons Ltd., 2012. New Delhi, India, 2012, ISBN: 978-0-470-66258-8, ISBN: 978-0-470-66259-5.

Adrian Linacre, Shanan Tobe (eds.) Wildlife DNA Analysis: Applications in Forensic Science. Wiley-Blackwell. 2013. ISBN: 978-0-470-66595-4 | ISBN-13: 978-047-0-66596-1

Links

Información sobre estadística de caza ilegal y actividades de protección de rinocerontes

https://www.environment.gov.za/update_on_rhinopoaching

<http://www.bdlive.co.za/national/science/2013/02/08/drones-now-part-of-anti-poaching-arsenal>

<http://www.iol.co.za/scitech/science/environment/drones-to-help-fight-in-anti-poaching-war-1.1526137#.UmlfG1NYWSo>

<http://www.rhodis.co.za/>

Pesca y tráfico ilegal de abalon

Rhodes University , Nota de perspectiva sobre la acción sobre la pesca y tráfico ilegal de abalon en la provincia sudafricana Eastern Cape, 9 de Noviembre de 2012

<http://www.ru.ac.za/perspective/perspectivearticles/name,72437,en.html>

Charla presentada por Vernon Munninck en el evento independiente de Ted^X “Who moved my sushi ? ” el 24 de marzo de 2012 en Cape Town. Vernon Munnick, Guardaparques de Cape Nature en la zona costera protegida de Hermanus, Sud África, comparte su experiencia de trabajo en una zona depredada por la pesca ilegal de abalon.

<http://www.youtube.com/watch?v=cNxa8uJHkGo>

[http://www.capenature.co.za/news.htm?sm\[p1\]\[action\]=content&sm\[p1\]\[cntid\]=2085&sm\[p1\]\[persistent\]=1](http://www.capenature.co.za/news.htm?sm[p1][action]=content&sm[p1][cntid]=2085&sm[p1][persistent]=1)

Links

<http://www.interpol.int/Member-countries/Africa/South-Africa>

<http://sansalvador.usembassy.gov/news/2011/09/26.html>

https://aelert.net/?page_id=1805 <http://www.asean-wen.org/index.php/about-us/what-is-asean-wen>

<http://earthday.worldwildlife.org/about/news-press>

<http://www.traffic.org/> <http://www.havocscope.com/value-of-the-illegal-wildlife-trade/> <http://www.havocscope.com/tag/wildlife-trafficking/>

8.12. Referencias Bibliográficas

Anderson S., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Eperon I.C., Sanger F., Young I.G., (1982) *Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome.* J Mol Biol. Número 156, pp.683–717.

Avise, J.C.; Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., and Saunders, N.C., (1987). *Annual Review of Ecology and Systematics.* Número 18, pp. 489-522.

- Ball, M.C., Finnegan, L.A., Nette, T., Broders, H.G., Wilson, P.J., (2011) *Wildlife forensics: "supervised" assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations*. *Forensic Sci Int Genet*. Jan; Número 5(1), pp. 50-56.
- Banks, M.A., Eichert, W., (2000.) *WHICHRUN (Version 3.2) a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data*. *Journal of Heredity*. Número 91, pp. 87-89.
- D'Amato, M.E., Alechine, E., Cloete, K.W., Davison, S., Corach, D., (2013) *Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study*. *Investigative Genetics* Número 4, pp. 6 doi:10.1186/2041-2223-4-6
- Evetts, I.W., Weir, B.S., (1998) *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Fung, W.K., Hu, Y.-Q., (2008) *Statistical DNA Forensics: Theory, Methods and Computation*. Wiley.
- Gupta, S.K., Bhagavatula, J., Thangaraj, K., Singh, L., (2011) *Establishing the identity of the massacred tigress in a case of wildlife crime*. *Forensic Sci Int Genet*. Número 5(1), pp. 74-75
- Harkins, G.W., (2006) *Studies on the population genetics of Euphausiids: a comparison of patterns in pelagic taxa displaying different distributions and life-histories*. PhD Thesis.: University of the Western Cape.
- Harper, C.K., Vermeulen, G.J., Clarke, A.B., de Wet, J.I., Guthrie, A.J., (2013) *Extraction of nuclear DNA from rhinoceros horn and characterization of DNA profiling systems for white (*Ceratotherium simum*) and black (*Diceros bicornis*) rhinoceros*. *Forensic Science International: Genetics*. Número 7, pp. 428–433.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., (2003) *Biological identifications through DNA barcodes*. *Proc Biol Sci*, Número 270, pp. 313–321.
- Kimura, M., (1980) *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. *J Mol Evol*. Número 16, pp. 111–120.

- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., (1985a) *Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA*. *Nature*. Número 314(6006), pp. 67-73.
- Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F., Semeonoff, R., (1985b) *Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints*. *Nature*. Número 317(6040), pp. 818-819.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., (1989) *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Número 86(16), pp. 6196-200.
- Linacre, A.M., Tobe, S.S., (2011) *An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science*. *Investigative Genet*. Número 2, pp. 2
- Lindsey, P., Balme, G., Becker, M., Begg, C., Bento, C., Bocchino, C., Dickman, A., Diggle, R., Eves, H., Henschel, P., Lewis, D., Marnewick, K., Mattheus, J., McNutt, J.W., McRobb, R., Midlane, N., Milanzi, J., Morley, R., Murphree, M., Nyoni, P., Opyene, V., Phadima, J., Purchase, N., Rentsch, D., Roche, C., Shaw, J., van der Westhuizen, H., Van Vliet, N., Zisadza, P.(2012) *Illegal hunting and the bush-meat trade in savanna Africa: drivers, impacts and solutions to address the problem*. Panthera / Zoological Society of London. Wildlife Conservation Society report, New York. 74 pages. Disponible en www.traffic.org
- Manel, S., Berthier, P., Luikart, G., (2002) *Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes*. *Conserv.Biol*. Número 16 (2002), pp. 650–659.
- Mardis, E.R., (2013) *Next-Generation Sequencing Platforms*. *Annual Review of Analytical Chemistry*. Número 6, pp. 287-303.
- Moritz, C. (1994). *Defining "evolutionary significant units" for conservation*. *Trends in Ecology and Evolution*. Número 9 (10), pp. 373– 375.

- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C., (1995) *Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears*. Mol Ecol. Número 4, pp. 347–354.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., (2004) *GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection*. Journal of Heredity Número 95, pp. 536-539.
- Post-Note 124 (2005) 236. The Parliamentary Office of Science and Technology. The Bushmeat Trade. www.parliament.uk/post/home.htm
- Rannala, B., and Mountain, J. L., (1997) *Detecting immigration by using multilocus genotypes*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Número 94, pp. 9197-9201.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., (2007) *BOLD: the barcode of life data system*. Mol Ecol Notes. Número 7, pp. 355–364.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science. Número 230 (4732), pp. 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Número 74 (12), pp. 5463–5467
- Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisie, M., Laudet, V., Hänni, C., (2008) *Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples*. J Appl Ecol, Número 45, pp. 967–975.
- Tobe, S.S., Kitchener, A.C., Linacre, A.M., (2010) *Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes*. PLoS One. Número 5(11), e14156.
- Yang, Z., Rannala, B., (2012) *Molecular phylogenetics: principles and practice*. Nature Reviews Genetics. Número 13, pp. 303-314.

WWF / Dalberg. (2012) *Fighting illicit wildlife trafficking: A consultation with governments*. WWF International, Gland, Switzerland.

Notas

(1) Publicó la hipótesis del origen africano de la humanidad, conocida como la hipótesis de la Eva africana en Science en 1987.

(2) En inglés billones = mil millones, pero para los idiomas latinos billón = millón de millón.

(3) Profesor Victor Crisci, comunicado a una clase de Introducción a la Taxonomía Numérica en 1985.

(4) **Rhino DNA technology helps fight against poaching**, noticia publicada por SABC news (South African Broadcasting Corporation) el 7 de septiembre de 2013. <http://www.sabc.co.za/news/a/bfe8ea80410281fc86f0a7434f2981a1/Rhino-DNA-technology-helps-fight-against-poaching-20130709>

CAPÍTULO 9

IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA EN VEGETALES

PROBLEMÁTICA DE LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL. NECESIDAD DE IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE PARA EVITAR FRAUDES Y PROBLEMAS DE SALUD Y ECONÓMICOS. BREVE REPORTE DE LOS OTROS MÉTODOS

*Rafael Melo Palhares, Marcela Gonçalves Drummond, Bruno dos Santos
Alves Figueiredo Brasil, Denise Aparecida Andrade de Oliveira*

9.1. Introducción

La identificación de la/s especie/s constituyente/s de productos vegetales debe ser garantizada, estén estos productos en forma de fitoterápicos, fitocosméticos o alimentos. La identificación de la materia prima vegetal sigue tradicionalmente criterios botánicos basados en datos taxonómicos, utilizando características macroscópicas y microscópicas, además de las caracterizaciones bioquímicas y organolépticas, y debe ser hecha por taxónomos altamente especializados (Figura 9.1). Sin embargo, en la mayoría de los productos descritos, el material vegetal no se puede caracterizar debido a las modificaciones generadas durante el proceso de producción, imposibilitando la identificación de especies a lo largo de la cadena productiva (Figura 9.2). Además de la pérdida de la caracterización generada por el procesamiento de la materia prima,

otros obstáculos comunes para la identificación vegetal son la comercialización de partes no identificables botánicamente, la existencia de taxa (unidad de clasificación biológica) con alta variación fenotípica, o incluso la existencia de diferentes grupos de vegetales que presentan características fenotípicas semejantes.



Figura 9.1: Exicatas preparadas para su identificación botánica y depósito en herbarios. A. *Herreria salsaparrilha* Mart, B. *Hymenaea courbaril* L.



Figura 9.2: Drogas vegetales. A. Un medicamento producido a partir de las muestras de B. De izquierda a derecha es posible visualizar: **A:** *Mentha piperita* L.; *Matricaria recutita* L. **B:** *Panax ginseng* L.; *Peumus boldus* Molina; *Passiflora incarnata* L.

En consecuencia, es posible encontrar en el mercado mundial de productos de origen vegetal diversos casos de sustituciones o fraudes en niveles preocupantes. Estos fraudes son realizados en muchos casos con la sustitución de la especie de interés por una de menor valor económico, llevando a perjuicios que pueden alcanzar a toda la cadena productiva. Por otra parte, el fraude por sustitución de especies ocurre muchas veces sin considerar la salud de los consumidores, utilizándose especies sustitutas que, además de no poseer las propiedades deseadas, pueden ser inseguras, produciendo alergias o envenenamientos.

Algunos estudios muestran el uso de metodologías tradicionales para el análisis de sustituciones de especies, como por ejemplo, la caracterización química y las cualidades organolépticas de los productos vegetales. Uno de ellos evaluó la autenticidad de los tés de plantas medicinales comercializados en tiendas naturistas de Belo Horizonte (Brasil). Cerca del 50% de las muestras analizadas fueron rechazadas por considerarlas falsificaciones de acuerdo a los exámenes visual, de aroma, sabor y de microscopía. En otro estudio se analizaron 42 productos fitoterápicos comercializados en Porto Alegre (Brasil) y se constató que el 71,4% no satisfacía los requisitos mínimos de calidad. Los problemas más frecuentes fueron sustituciones de especies, contaminaciones o ausencia del componente químico principal. Un análisis de autenticidad de 10 muestras de cangorosa o espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) comercializadas en el estado de Goiás (Brasil) mostró que siete estaban de acuerdo con las especificaciones del rótulo, dos no presentaban nomenclatura científica y una pertenecía al género *Sorocea*. Aunque el género *Sorocea* incluya una especie conocida comúnmente como espinheira santa, el rotulado como tal constituye una falsificación en relación a la especie oficialmente presente en la Farmacopea Brasileira. Otro análisis mostró que, de 252 muestras vegetales recolectadas en tiendas naturistas de cinco regiones geográficas de Brasil, apenas 126 (50,2%) correspondían a la especie declarada.

Los resultados mostrados en estos estudios reflejan las dificultades de identificación de la materia prima utilizada en drogas vegetales y demuestran que es necesaria la aplicación de metodologías más precisas de modo de detectar irregularidades. Existe la expectativa de que el aumento de la fiscalización y la utilización de metodologías más confiables conduzcan a una mejoría en la calidad de los productos.

9.2. Métodos para la identificación de especies vegetales basados en ADN: regiones del ADN analizadas (cloroplasto vs. genómico)

Código de barras de ADN: ¿qué es y cuáles son sus beneficios?

La metodología de identificación de especies por código de barra de ADN (DNA barcode) es un sistema capaz de utilizar secuencias de ADN específicas de forma análoga a un código de barras identificador para cada taxón, funcionando como un sistema bioidentificador global, práctico, económico y específico.

Desde su desarrollo, esta metodología va llamando la atención de los grupos de investigación y otras entidades, dada su aplicación y versatilidad. En el año 2004, se creó un gran consorcio, el CBOL (<http://www.barcoding.si.edu>), que tiene como objetivo promover esta técnica como un estándar global para la identificación basada en secuencias de eucariotas. En el 2010, se lanzó un proyecto de ámbito internacional, el IBOL, que es una red de colaboración internacional de 26 países que busca establecer un sistema de identificación automática basado en una biblioteca de código de barra de ADN de todos los eucariotas.

El rápido progreso y consecuente estandarización de esta técnica impulsó la creación de un banco de datos mundial (BOLD) creado y mantenido por el COBL, que tiene como objetivo el almacenamiento y la disponibilidad de los códigos de barra genéticos desarrollados en todo el

Inicialmente propuesto para la identificación de especies animales, la metodología que utiliza el código de barras de ADN se basa en la amplificación y secuenciación de una región del gen mitocondrial que codifica para la enzima COI. La elección de la región genómica a ser utilizada sigue los siguientes criterios básicos:

- Universalidad del par de primers utilizado. Calidad de la secuencia.
- Cobertura en la secuenciación bidireccional. Poder de discriminación.
- Potencial de estandarización.

Siguiendo estos criterios, una región seleccionada como código de barras de ADN debe involucrar pocos loci, preferiblemente uno, que pueda ser secuenciado de forma rutinaria y confiable en una amplia gama de especies y muestras, resultando en datos fácilmente comparables que permitan la identificación de las distintas especies.

El código de barras de ADN ya estandarizado para las especies animales (COI) ya citado cumple de forma satisfactoria con todos estos criterios y viene siendo utilizado ampliamente en todo el mundo.

Para los vegetales, la determinación de un marcador molecular que pueda ser utilizado como código de barras de ADN eficiente se vuelve más difícil y desafiante. Desde la propuesta inicial del código de barras de ADN, diferentes grupos trabajaron en la estandarización de un código de barras de ADN vegetal. Esto condujo a la generación de una gran cantidad de datos e hizo que los diversos grupos defendieran la utilización de distintas regiones genómicas.

El principal factor que dificultó la estandarización del código de barras de ADN vegetal fue la propia característica de este grupo de seres vivos. Debido a las bajas tasas de sustitución de nucleótidos en el ADNmt vegetal, las regiones de esta organela fueron descartadas como potenciales códigos de barra. Por lo tanto, los grupos de investigación se volcaron al ADN nuclear o al cloroplástico.

Debido a la gran variación de ploidía de los vegetales, el DNA nuclear no resultó una opción viable, pues los resultados obtenidos del análisis de estas regiones podrían ser enmascarados debido a los diversos tipos de heterocigotos. A pesar de eso, aun hoy algunos grupos defienden la utilización de regiones no codificantes como los ITS (internal spaced transcriber) o el ITS2 (Internal spaced transcriber 2) de forma complementaria al código de barras de ADN oficial.

Por lo tanto, el ADN proveniente de los cloroplastos fue elegido para el desarrollo del código de barras de ADN de especies vegetales. La presencia de múltiples copias del ADN cloroplástico en una misma célula aumenta la probabilidad de detección de una secuencia específica e incrementa la posibilidad de amplificar fragmentos de ADN no dañados, incluso después de procesamientos que llevan a la degradación.

A lo largo de los años, diversas combinaciones de regiones cloroplastídeas fueron sugeridas como candidatas al código de barras de ADN, siendo ellas codificantes (genes *matK*, *rbcL*, *rpoB* y *rpoC1*) o no codificantes (*atpF–atpH*, *trnH–psbA*, *psbK–psbI*). Estas regiones fueron analizadas en forma separada y en conjunto en la tentativa de evaluar cuál de ellas proporcionaría los mejores beneficios inherentes al código de barras genético:

rpoC1 + rpoB + matK

*rpoC1 + matK + trnH-
psbA rbcL + trnH-psbA*

*atpF-H + psbKI + matK
matK + rbcL + trnH-
psbA rbcL + matK*

A pesar de diversas tentativas de trabajar con tres regiones, el grupo CBOL, responsable de la delimitación de las regiones del barcode, optó por la utilización de dos regiones con el fin de evitar gastos y tiempo excesivo en el procesamiento de las muestras. A partir de esa decisión y

del análisis de dos candidatos potenciales, el grupo CBOL lanzó oficialmente en 2009 el código de barras de ADN vegetal, conformado por la unión de dos regiones de los genes matK y rbcL.

El gen matK posee una de las tasas más rápidas de evolución y, consecuentemente, un mayor poder de discriminación dentro de las regiones cloroplastídeas codificantes analizadas. Sin embargo, existen dificultades para el diseño de primers universales capaces de amplificar el ADN de todas las especies vegetales. Si bien el gen rbcL es de fácil amplificación, recuperación y análisis, no presenta el mismo poder de discriminación que la región matK. Por lo tanto, la combinación de esas dos regiones satisface los criterios de universalidad, poder de discriminación entre taxa y potencial secuenciación no ambigua y de calidad requeridos para el barcode genético.

9.2. Identificación de la especie de origen en muestras forenses: casos en que la identificación de un resto vegetal permite asociar con el lugar del hecho

Los perfiles de ADN vienen siendo utilizados desde hace algún tiempo para procedimientos legales cuando se trata de casos humanos. Algunos ejemplos son la prueba de culpabilidad o inocencia en un crimen, la comprobación de la paternidad, la identificación de restos humanos en casos de personas desaparecidas o en caso de víctimas de desastres en masa, la comprobación de ciudadanía en casos de inmigración, entre otros. Más recientemente, análisis de perfiles de ADN también han sido aplicados en animales, como la identificación de comercio de especies en extinción, análisis de paternidades y traza de apareamientos.

La presencia ubicua de especies vegetales convierte a los vestigios botánicos en muestras de utilidad para muchas investigaciones forenses. Sin embargo, este recurso todavía está subutilizado debido a la falta de experiencia y conocimiento botánico entre investigadores y la

dificultad de identificar muestras degradadas de forma rutinaria por medio de las características botánicas. La identificación de vegetales a nivel de especies o individuos puede ayudar a determinar el origen geográfico de la muestra, mostrar conexiones entre escenas del crimen e individuos, poner a prueba coartadas, comprobar la posesión o venta de especies prohibidas o en riesgo de extinción, entre otros potenciales usos.

Con los recientes avances en técnicas moleculares y la estandarización de secuencias identificadoras para vegetales, ya sea del código de barras de ADN o de otras regiones cloroplásticas o nucleares, como también las metodologías de secuenciación de nueva generación, la identificación de plantas terrestres se ha vuelto cada vez más útil en el análisis forense. En el caso de la identificación de individuos, son ampliamente usadas las técnicas de RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) y más recientemente los microsatélites (STR). Estos son pequeñas regiones de ADN con repeticiones de pares de bases (normalmente de una a cuatro) en una frecuencia determinada. Las regiones de microsatélites poseen una alta tasa de mutación cuando se comparan con otras regiones del ADN y son utilizadas rutinariamente como marcadores genéticos en humanos. Además, estas regiones son empleadas para estudios de patrones de polinización, dispersión de semillas, flujo génico e hibridación.

Las técnicas moleculares reducen la necesidad de especialistas en la identificación botánica y son fácilmente estandarizables en los laboratorios. Algunos ejemplos de utilización forenses de estas técnicas se detallan a continuación.

En el año 1992, en Arizona, EE.UU, se encontró el cuerpo de una mujer y, al lado de su cuerpo, un beeper que llevó a la policía hacia un sospechoso. La principal evidencia utilizada en el juicio fue un conjunto de secuencias de ADN obtenidas de semillas presentes en la capota de la camioneta del sospechoso. El científico responsable del análisis, Tim Helentjaris de la Universidad de Arizona, Tucson (EE.UU), utilizó la

técnica de RAPD y, debido a la variabilidad genética encontrada en la especie analizada (Árbol Palo verde, *Parkinsonia microphylla*), pudo asociar la presencia de la camioneta y por lo tanto del sospechoso con el área específica en la que fue encontrado el cuerpo. La aceptación de esta evidencia por parte de la justicia marcó uno de los primeros casos de aceptación de evidencia genética vegetal para la determinación de la culpabilidad de un crimen e incentivó el avance de investigaciones en esta área.

En el año 2000, un artículo publicado por Congiu y colaboradores describió la utilización de la misma técnica de RAPD para la identificación de una variedad de frutilla. Una corte italiana se vio delante de un caso de comercialización no autorizada de una variedad patentada de frutilla (Marmolada®). Esta variedad es bastante resistente a climas fríos y tiene una alta productividad, además de ser resistente a las plagas. A partir del análisis de RAPD, el laboratorio contratado pudo certificar que de un total de 31 plantas incautadas, 13 pertenecían a la variedad patentada. Como consecuencia del fallo emitido se decomisaron las plantas y se aplicó una multa al infractor.

En 2001, se encontró el cuerpo de un hombre de aproximadamente 30 años en una región del sur de Finlandia, un mes después de ser visto por última vez en compañía de tres hombres. Estas tres personas, sospechosas del crimen, fueron presas pero no se había encontrado ninguna evidencia forense que las ligara con el cuerpo encontrado. Durante la investigación se identificaron vestigios de especies de briófitas en el auto de los sospechosos, encontradas también en la escena del crimen. Un equipo de científicos trabajando en ese caso identificó las especies de briófitas *Brachythecium albicans*, *Calliergonella lindbergii* y *Ceratodon purpureus* en el auto de los sospechosos y encontró colonias de las mismas tres especies en el lugar del crimen, próximas al cuerpo de la víctima. Para el análisis fueron elegidas las dos primeras especies por poseer reproducción clonal y, consecuentemente, menor variabilidad genética. A partir del análisis de los perfiles de ADN

por RAPD y STR fue posible concluir que la muestra de *B. albicans* obtenida en el auto de los sospechosos tuvo su origen en la escena del crimen, mientras que la muestra de *C. lindbergii* se habría originado en la escena del crimen o sus alrededores, proporcionando argumentos para que la fiscalía presente el caso.

En el año 2007, Craft y colaboradores publicaron un artículo científico demostrando el uso de análisis de microsatélites en un intento de relacionar hojas presentes en el auto de un sospechoso de un crimen local. Éste se trataba de un doble homicidio en el que se encontraron enterrados los cuerpos de una madre y su hijo recién nacido en una fosa en la región central de Florida, EE.UU. A pocos metros de la fosa se identificaron tres árboles de la especie *Quercus geminata*, una especie de roble. Durante la investigación policial se identificó un sospechoso al que le encontraron en el auto dos hojas identificadas como de la especie *Q. geminata* y una tercera hoja de la especie *Q. virginiana*, una especie próxima a la primera. El grupo de Craft utilizó el análisis de cuatro microsatélites en las hojas del auto del sospechoso y en las hojas del lugar del enterramiento. El resultado obtenido llevó a la comprobación de la inocencia del sospechoso en cuestión, ya que las hojas encontradas en el auto tenían un perfil de ADN diferente de las encontradas en los árboles cerca de la fosa.

En 2011, Rotherham y Harbison publicaron un artículo describiendo el uso de marcadores genéticos para distinguir variedades de marihuana (*Cannabis sativa*). De acuerdo con los autores, de Nueva Zelanda, la marihuana es al mismo tiempo una droga ilícita y un cultivo legal, ya que puede ser utilizada para la producción de fibras y aceites de semillas. La diferenciación de sus propósitos de cultivo se hace de acuerdo a los niveles de THC (tetrahidrocanabinol) en la planta adulta, la sustancia activa responsable de los efectos psicoactivos de esa planta. La diferencia de los niveles de THC se debe a las características genéticas de las diferentes variedades de *C. sativa*. Por lo tanto, las metodologías genéticas capaces de diferenciar las variedades con altos niveles de

THC de las variedades con bajos niveles son capaces de diferenciar los cultivos comerciales legítimos de los cultivos dedicados al narcotráfico. Si bien la utilización de marcadores genéticos para diferenciar variedades de *C. sativa* se ha generalizado, presenta algunas restricciones ya que requieren de la amplificación de fragmentos de gran tamaño, los que dificulta el análisis de muestras con ADN degradado y además no abarca a muchas variedades. Los investigadores demostraron que este nuevo análisis de SNPs, identificados y estandarizados en su laboratorio, permite identificar muestras para discriminar con facilidad entre variedades de Cannabis con alta y baja producción de THC.

9.3. Detección de fraude e identificación incorrecta en alimentos de origen de vegetal. Problemática y ejemplos (te, maderas, aceites, plantas medicinales, vinos)

A medida que las industrias alimentaria y medicinal se convirtieron en globales y de mayor complejidad, surgió un nuevo desafío para la seguridad de los consumidores de esos segmentos de productos. El aumento de la complejidad de la cadena de producción y de la distancia entre el productor y el consumidor final hizo más difícil el seguimiento de la autenticidad de las especies a lo largo de la misma.

En este universo, un problema que va ganando cada vez más visibilidad es el fraude realizado por la codicia de productores, fabricantes, procesadores, distribuidores y vendedores, que buscan aumentar su ganancia disminuyendo la calidad del producto final con la sustitución de especies por otras de menor valor.

Los ejemplos de utilización de metodologías moleculares de estos fraudes son cada vez más comunes. En 2011, Guo y colaboradores identificaron un problema con la hierba medicinal china *Scutellaria*

baicalensis. Esta especie vegetal tiene una amplia distribución en el nordeste de China y áreas adyacentes a Japón, Corea Mongolia y Rusia. Sus raíces son utilizadas desde hace más de dos mil años para el tratamiento de hepatitis, ictericia, diarrea y enfermedades inflamatorias. Debido a la alta demanda en el mercado y a la sobreexplotación de las últimas décadas, se produjo un descenso de la disponibilidad natural de *S. baicalensis*. Debido a la escasez, se volvieron comunes las adulteraciones con especies del género *Scutellaria* como *S. amoena*, *S. rehderiana* y *S. viscidula*. Como esas especies adulterantes poseen compuestos activos diferentes de los de la especie medicinal *S. baicalensis*, se observaron en la población efectos terapéuticos no deseados. Se hicieron tentativas de control de calidad basadas en análisis químicos y microscópicos, que no tuvieron el efecto deseado debido a la variación de concentraciones químicas de los principios activos que dependen fuertemente de las condiciones ambientales y a la necesidad de especialistas altamente entrenados, además de un largo tiempo de preparación de muestras para el análisis. Para solucionar este problema, un grupo de investigación aplicó la metodología de barcoding de ADN, incluyendo también análisis de la región intergénica *psbA-trnH*. Con esta metodología fue posible distinguir a la especie medicinal *S. baicalensis* de sus adulterantes más comunes, conduciendo a la estandarización de un método más eficiente que puede ser aplicado en busca de una mayor seguridad ante el consumo medicinal de esta especie en particular.

China es reconocida como uno de los países de mayor utilización de medicamentos a base de especies vegetales, practicada desde hace milenios. Con el aumento de estudios de reconocimiento de eficacia y seguridad de determinados fitoterápicos, este país pasó a ser uno de los mayores exportadores del mundo. Sin embargo, la regulación de esa clase de medicamentos y su fiscalización es aún incipiente y, en muchos casos ineficaz.

En 2012, una incautación de mercadería originaria de China dio origen a otro trabajo. A pedido de la aduana australiana, Colghlan y colaboradores realizaron análisis de secuenciación de nueva generación de medicamentos fitoterápicos oriundos de China. Con esta metodología es posible la secuenciación rápida de genes, genomas y metagenomas, originando una gran cantidad de datos y posibilitando un análisis detallado de diversas especies simultáneamente. Según los autores, este es el primer trabajo que muestra el uso de esa tecnología de secuenciación para el análisis de medicamentos compuestos de diferentes especies animales y vegetales. A partir de la secuenciación de las muestras el grupo pudo observar la presencia de especies vegetales no declaradas en los medicamentos analizados, entre ellas especies que contienen sustancias alergénicas, sustancias tóxicas, especies encuadradas en listas internacionales de protección por estar en riesgo de extinción, especies sin reconocimiento medicinal conocido, como también especies conocidas por acumular metales pesados como mercurio, cobre, arsénico y plomo.

En conjunto, estos fraudes no sólo llevan a un descrédito de los medicamentos fitoterápicos, con el consecuente retroceso en la aceptación de esta importante clase de medicamentos, sino que también pone en riesgo inmediato la salud de la población que vaya a consumirlos. Debido al procesamiento por el que pasan estos productos, la identificación de las especies sería imposible por una técnica no molecular. Por ese motivo, este estudio, además de tantos otros, muestra que el análisis del material genético está siendo y debe ser cada vez más común en aplicaciones forenses debido a su versatilidad de aplicación, confiabilidad, rapidez y simplicidad relativa, pudiendo ser estandarizado y aplicado con rapidez y eficiencia, resolviendo cuestiones antes irresolubles.

Los fraudes por adulteraciones son observados en medicamentos a base de vegetales y también se los encuentra en la industria alimenticia. Un ejemplo son los aceites de oliva. La población de la región del

Mediterráneo tiene la tradición de usar aceite de oliva en diversos alimentos. El producto preserva el gusto, aroma y las vitaminas de las aceitunas. Además de esto, el aceite de oliva posee propiedades reductoras de la presión sanguínea y del colesterol LDL, factor que puede contribuir a la baja incidencia de enfermedades coronarias en esta región. Utilizando metodologías innovadoras para la extracción del material genético, Kumar y colaboradores (2011) pudieron amplificar material genético presente en las muestras de aceite de oliva. Realizando análisis de las secuencias matK y psbA-trnH, estos investigadores consiguieron demostrar que en algunos casos el aceite de oliva tenía adición de aceites más baratos y de menor calidad, como el aceite de canola o de girasol genéticamente modificado, ambos conteniendo mayores cantidades de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, disminuyendo la calidad del aceite de oliva y llevando a la población a consumir productos de menor calidad que la esperada.

También en 2011, un grupo de investigación liderado por Stoeckle publicó un trabajo en el cual se hizo un análisis del material genético presente en té. Estas infusiones acuosas son consumidas mundialmente por su sabor o por sus beneficios para la salud, dependiendo de la especie vegetal utilizada. Debido a la naturaleza fragmentada de los vegetales comercializados para té y a la amplitud taxonómica de las especies utilizadas, la correcta identificación del embalaje es esencial para garantizar al consumidor los beneficios deseados y la seguridad. En este estudio, además de comprobar la eficiencia de la aplicación del barcode de ADN para la correcta identificación de los té, los investigadores pudieron observar que en aproximadamente el 35% de las muestras analizadas se encontraron especies vegetales diferentes de las descritas en los rótulos. Con los resultados obtenidos en este estudio quedan claros los beneficios que se obtienen a partir del análisis de ADN para uso forense y a partir de la estandarización mundial de la metodología del barcode de ADN.

9.4. Referencias Bibliográficas

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 14 de 30 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 5 de abril de 2010.
- Ausubel, J. H. (2009) A botanical macroscope. *Proc Natl Acad Sci*, 106: 31, 12569-12570.
- Brandão, M. G. L. (2007) Dossiê Técnico: Produção de chás e extratos de plantas medicinais. *Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais*, 24.
- Brandão, M. G. L. et al. (2013) Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. *Environ Monit Assess*, 185: 8, 7013-7023.
- Carvalho, D. C. et al. (2008) Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). *Rev Bras Reprod Anim*, 32, 215-219. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106, 31, 2009.
- Coghlan, M. L. et al. (2012) Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns. *PLoS Genet*, 8: 4, e1002657.
- Congiu, L. et al. (2000) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Mol. Ecol*, 9, 229-232.
- Craft, K. J. et al. (2007) Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *N. 165*, 64-70.
- Ferri, G. (2009) Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using barcoding approach. *Int. J. Legal Med.*, 123, 395-401.
- Guo, X. et al. (2011) DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. *Biol Pharm Bull*, 34:8, 1198-1203.
- Herbert, P. D. N. et al. (2003) Biological Identification through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond*, 270: 1512, 313-321.

- Hollingsworth, P. M.; Graham, S. W.; Little, D. P. (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*, 6: 5, e19254.
- Korpelainen, H. & Virtanen, V. (2003) DNA fingerprinting of mosses. *J. Forensics Sci*, 48: 4, 1-4.
- Kumar, S.; Kahlon, T.; Chaudhary, S. (2011) A rapid screening for adulterants in olive oil using DNA barcodes. *Food Chem*, 127, 1335-1341.
- Ribeiro, P. A. M. et al. (2005) Controle de qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2: 2, 176-179.
- Rotherham, D. & Harbison, S. A. (2011) Differentiation of drug and non-drug Cannabis using a single nucleotide polymorphism (SNP) assay. *Foren. Sci. Intern.*, 207, 193-197.
- Stoeckle, M. Y. et al. (2011) Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Sci Rep*, 1, 42.
- Sucher, N. J.; Carles, M. C. (2008) Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Med*, 74: 6, 603-623.
- Yoon, C. K.,(1993) Botanical witness for the prosecution, *Sci.*, 260, 894– 895.
- Zuccolotto, T.; Apel, M.; Rates, S. M. K. (1999) Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre- RS. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 58: 2.

CAPÍTULO 10

LEGISLACIÓN, CERTIFICACIÓN Y ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS

CALIDAD: DEFINICIÓN. EVOLUCIÓN. NORMALIZACIÓN. CERTIFICACIÓN.
ACREDITACIÓN. AUDITORIAS. CONTROL DE CALIDAD. ENTIDADES
CIENTÍFICAS Y ASOCIACIONES DEDICADAS A LA GENÉTICA FORENSE
HUMANA Y NO HUMANA A NIVEL INTERNACIONAL Y EN ARGENTINA.
LABORATORIOS FORENSES NO HUMANOS EN ARGENTINA

Virginia Aliverti y Pilar Peral García

10.1 Introducción

La demanda de pruebas genéticas de identidad y forense animal se han vuelto frecuentes en nuestro país, hecho que hace cada vez más importante y necesario disponer de ciertas pautas que garanticen cualquier seguimiento o escrutinio legal.

Como se mencionó en el capítulo 1, para garantizar la calidad y repetitividad de los resultados obtenidos para la resolución de un caso forense y la posterior elaboración del informe, el laboratorio de genética forense debe contar con un proceso que asegure la calidad de los mismos.

Actualmente existe una tendencia global hacia la cual resulta inevitable para el mejor desempeño de las instituciones la implantación de un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) (AETS, 2007). El SGC no es más que un "sistema de gestión para dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad" (ISO 9000, 2005).

Durante la rutina diaria en el laboratorio, no resulta fácil controlar todos los aspectos relacionados con los ensayos y las mediciones que se realizan hasta obtener un resultado, ya que estas van a depender de varios factores, como equipos, insumos y hasta de los propios analistas; por lo tanto, alcanzar la calidad es una tarea que involucra a todos los sectores del laboratorio (Figura 10.1).



Figura 10.1: Pasos para el procesamiento de la muestra. Es importante mantener la trazabilidad durante todo el procedimiento, de esta forma, si ocurre un error, se puede determinar en qué paso ocurrió.

Con la gestión de calidad se establece la asignación de responsabilidades y la documentación de recursos humanos y técnicos a través de una sistematización y organización de procedimientos adecuados. Esto permite una práctica de calidad en los ensayos realizados por profesionales, estudiantes y personal del laboratorio.

10.1.2. Calidad: Definición

El concepto de calidad viene del latín *Qualitas* y está asociado al atributo o la propiedad que distingue a las personas, bienes o servicios. Según el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, calidad es la propiedad o conjunto de propiedades inherentes a una

cosa que permiten apreciarla como igual, mejor o peor que las restantes de su especie (Real Academia de la Lengua Española, 2004). Para la Organización Internacional de Normalización (ISO, del inglés *International Organization for Standardization*), calidad es el “grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos” (ISO 9000, 2005). Los instrumentos adecuados para garantizar la calidad en un laboratorio incluyen acreditación, certificación, pruebas de aptitud, medidas internas para garantizar la calidad, documentación de políticas y procedimientos y/o el control de la competencia del personal, que puede incluir una certificación o registro del personal de laboratorio (AETS, 2007).

10.1.3. Calidad: Evolución

La calidad ha transitado por varias etapas en su devenir histórico, que se pueden resumir en Inspección de la calidad; Control de la calidad; Aseguramiento de la calidad; Gestión de la calidad y Gestión total de la calidad.

El SGC se implementa dentro de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), "conjunto de requisitos científico-técnicos y organizativos que deben satisfacer los laboratorios para demostrar su competencia para realizar determinados ensayos y garantizar la calidad y confiabilidad de los resultados de dichos ensayos" (CI-ENAC-BPL, 2008).

Los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) describen los métodos que permiten llevar a cabo las operaciones una manera eficaz durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio. Representan documentos escritos que describen Qué, Cuándo, Quién y Cómo. La aplicación de los POES brinda la posibilidad de responder rápidamente a fallas en la calidad y constituyen un complemento de la BPL.

Es a partir de 1987 que la ISO describe las relaciones entre el control de la calidad interno y externo y el aseguramiento de la calidad como “todas aquellas acciones planificadas y sistemáticas, necesarias para proporcionar la seguridad adecuada de que un producto o servicio

satisfacen determinados requerimientos de calidad” (Escobar Carmona et. al., 2009).

El aseguramiento de la calidad hace referencia a que una organización decide implantar un SGC, como por ejemplo, el basado en las normas ISO 9000. Existen diversos modelos de excelencia que actúan como complemento a las normas ISO 9000 y suman cuestiones como la importancia de las relaciones con todos los clientes, usuarios y los resultados de la misma. Tal es el caso del Modelo Baldrige en los Estados Unidos, el Modelo Europeo European Foundation for Quality Management (EFQM) y el Modelo de Calidad Total de origen japonés (TQC) (Figura 10.2).



Figura 10.2: Factores que determinan el Modelo de Calidad Total (TQC).

10.2. Normalización. Certificación. Acreditación de Laboratorios

La tendencia tanto a la certificación como a la acreditación de los SGC en los laboratorios se extiende hoy a todos los ámbitos de la actividad. La razón de esta tendencia no radica solamente en las exigencias crecientes de los clientes, dado que muchas organizaciones han tomado conciencia de la necesidad de mejorar sus procesos y asegurar sus resultados.

10.2.1. Normalización

La ISO define las normas como "... acuerdos documentados que contienen especificaciones técnicas y otros criterios precisos para su uso consecuente como reglas, directrices o definiciones, con el objetivo de asegurar que los materiales, productos, procesos y servicios sean apropiados a su fin" (ISO 9000, 2005). Las normas pueden servir de base técnica para el comercio en los productos finales y servicios entre compradores y vendedores, o como un medio para facilitar la conformidad con las reglamentaciones técnicas. La normalización, es decir la adhesión a procedimientos o especificaciones de productos, incluye el desarrollo y la provisión de normas y el suministro de información sobre ellas a las partes interesadas, y ocurre en varios niveles (ISO 9000, 2005). Las normas regionales son aquellas que han sido elaboradas en el marco de un organismo de normalización regional, normalmente de ámbito continental, que agrupa a un determinado número de organismos nacionales de normalización. Como ejemplo, podemos citar las normas IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación), COPANT (Comisión Panamericana de Normas Técnicas), CEN (Comité Europeo de Normalización), CENELEC (Comité Europeo de Normalización Electrotécnica), AMN (Asociación Mercosur de Normalización), RAN (Red Andina de Normalización) y CROSQ (Organización Regional de Normas y Calidad de CARICOM). Por su parte, las normas internacionales son aquellas que han sido elaboradas por un organismo internacional de normalización. Las más representativas por su campo de actividad son ISO, IEC (Comité Electrotécnico Internacional), ITU (Unión Internacional de Telecomunicaciones), CODEX FAO/OMS Normas de Alimentos (Codex Alimentarius) y WSSN (Red de Servicio de Normas Mundiales).

10.2.1.1. Normas ISO

ISO es una federación mundial que cuenta actualmente con 159 países miembros sobre la base de un miembro por país. El miembro de ISO es un “organismo nacional de normalización” (ONN), el más representativo de la normalización en su país y por lo general a cargo de la normalización voluntaria por un mandato oficial de su gobierno (Normas Internacionales y Normas privadas, ISO 2010). En nuestro país, el representante ante la ISO es el IRAM.

En este sentido, las normas ISO proveen una base técnica para la legislación en materia de salud, de seguridad y medio ambiente y contribuyen a proteger a los consumidores.

Actualmente, a nivel mundial las normas de la serie ISO: ISO 9000, ISO 14000 y sus distintas aplicaciones específicas, como la ISO 17025: 2005, son requeridas debido a que garantizan la calidad de un producto o servicio mediante la implementación de controles exhaustivos, asegurándose que todos los procesos que han intervenido para ello operan dentro de las características previstas.

Normas ISO 9000

La familia de normas ISO 9000 constituye un conjunto de normas del SGC que permiten asegurar que el producto o servicio que sale de una organización satisfaga los requerimientos del cliente. Se deben registrar todos los procesos realizados y además utilizar las auditorías internas para asegurarse de mantener el sistema.

ISO 9000 — Sistemas de Gestión de la Calidad – Fundamentos y vocabulario.

ISO 9001 — Sistemas de Gestión de la Calidad – Requisitos. (Es una norma que se certifica).

ISO 9004 — Sistemas de Gestión de la Calidad – Directrices para la mejora del desempeño.

ISO 14000— Gestión Ambiental.

ISO 17025 — Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. (Es una norma que se acredita).

Norma ISO 17025:2005 IRAM 301

La norma internacional ISO/IEC 17025:2005 IRAM 301 “*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo*” contiene los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y/o calibración para demostrar la competencia de generar resultados técnicamente válidos.

La competencia técnica se basa en tres pilares fundamentales: el personal calificado, los métodos normalizados o validados y el instrumental calibrado y trazable a las unidades del Sistema Internacional (SI).

10.2.2. Certificación

Las normas ISO 8402, ISO 65 y de la Guía ISO/CEI 2 definen la certificación como el “procedimiento mediante el cual un organismo da una garantía por escrito de que un producto, un proceso o un servicio está conforme a los requisitos especificados en la norma” (FAO, 2002). El otorgamiento de una garantía escrita o de un certificado se basa en un informe de inspección que puede o no contener información de fuentes secundarias.

Una etiqueta de certificación es un símbolo que indica que el cumplimiento de las normas ha sido verificado. Por lo general, el uso de dicha etiqueta está regulado por el organismo que establece las normas.

10.2.3. Acreditación

La acreditación es el procedimiento mediante el cual un organismo de acreditación autorizado reconoce formalmente que una organización es competente para la realización de una determinada actividad de evaluación de la conformidad (FAO, 2002). Se confirma la capacidad de

esa organización en el cumplimiento de las actividades mediante normas mundiales.

La acreditación se aplica a laboratorios, organismos de inspección y organismos de certificación y está destinada a generar confianza en los resultados de las certificaciones, inspecciones, ensayos y calibraciones, dando respaldo de confiabilidad a los organismos de evaluación de la conformidad. Cuando la acreditación es reconocida internacionalmente, otorga credibilidad y transparencia al mercado y facilita el comercio.

10.2.3.1 Normalización, certificación y acreditación

La puesta en práctica de normas de calidad, la certificación y la acreditación requieren de inversión y capacitación de toda la organización que decide implementar un SGC.

Los organismos de normalización se estructuran en comités técnicos, cada uno de los cuales trata una temática distinta y en el que están representadas todas las partes interesadas en la materia. Las entidades de certificación son a su vez evaluadas por Entidades Nacionales de Acreditación, a fin de disponer de un reconocimiento de su capacidad para realizar su función como entidad evaluadora de la conformidad.

Como se mencionó, las Entidades de Acreditación se encargan de reconocer la capacidad de evaluar la conformidad y emitir certificados e informes de los organismos evaluadores de la conformidad: entidades de certificación, laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración y entidades de inspección.

De este modo, cada país dispone de una infraestructura de la calidad, conformada por un organismo nacional de normalización y una entidad nacional de acreditación; en Argentina estas entidades son el IRAM y el OAA (Organismo Argentino de Acreditación), respectivamente. A fin de facilitar la validez internacional de los certificados emitidos por las entidades de certificación que acreditan, las entidades de acreditación de unos y otros países mantienen entre sí acuerdos de reconocimiento

de los certificados que emiten, en el marco de una organización mayor (IAF - International Accreditation Forum).

A continuación se mencionan algunas Entidades de Acreditación en el mundo: ANSI-ASQ National Accreditation Board (ANAB) en EEUU, Entidad Costarricense de Acreditación (ECA) en Costa Rica, Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) en España, Organismo Uruguayo de Acreditación (OUA) en Uruguay.

10.2.4. Auditorias

Las auditorias permiten controlar el funcionamiento de los sistemas de calidad en los laboratorios. Incluyen la realización de evaluaciones periódicas del grado de cumplimiento de las normas de aplicación y requisitos internos del SGC, según el modelo implantado.

Las auditorías internas son llevadas a cabo por el personal propio del laboratorio calificado o por personal contratado que cumpla el perfil de auditor. La realización de auditorías internas es un requisito de las normas de calidad y además sirven como “autodiagnóstico” sobre la situación del laboratorio.

Las auditorías externas son realizadas por un organismo de acreditación o certificación u organizaciones externas al laboratorio. Las personas escogidas para este tipo de proceso de auditoría son expertos en el campo aseguramiento de calidad y generalmente cuentan con sólidos conocimientos de los métodos y técnicas de auditoría.

Como parte de su sistema de calidad, el laboratorio debe implementar un programa de aseguramiento de la calidad, tanto interno como externo, que asegure y demuestre que los ensayos se encuentran bajo control y que proporcionan resultados válidos y confiables.

10.2.5. Control de calidad

Las consecuencias de los errores durante el análisis de casos en forense son determinantes ya que muchos análisis se utilizan para la resolución de casos legales (Schneider, 2007); por lo tanto, cada vez es

más importante contar con un conjunto de directrices mínimas para las prácticas de calidad que pueden resistir el escrutinio legal. Ante la falta de protocolos estandarizados, durante el análisis forense creció la demanda por el control de calidad de rutina en los laboratorios, lo que determinó las permanentes recomendaciones de los organismos científicos (Schneider, 2007). Un claro ejemplo de ello es que la mayoría de los errores se originan durante el procesamiento de una muestra, en gran medida debido a la falta de registros (Prieto et.al., 2011 y Budowle et.al., 2005).

Como ya mencionamos, la garantía de calidad (QA, quality assurance) y el control de calidad (QC, quality control) son necesarios para garantizar resultados confiables y de alta calidad (Budowle et.al., 2005). QA y QC no son sinónimos; QA es el seguimiento de las actividades que tienen por objeto verificar si las prácticas y los resultados de las pruebas son el suministro de información fiable. QC es un mecanismo o actividad destinado a verificar si las condiciones de prueba funcionan apropiadamente para producir resultados fiables (Budowle et.al., 2005).

Un programa de control de calidad debe incluir los controles a realizar, su frecuencia, los criterios de aceptación y las acciones a tomar cuando los resultados de dichos controles se encuentren fuera de los criterios especificados.

Los controles internos de calidad tienen como objetivo la evaluación continua del trabajo de laboratorio. Se realiza un listado de actividades relacionadas al ensayo, como por ejemplo control de las condiciones de trabajo (ambientales, de los materiales de referencia, de los materiales y equipos utilizados en los ensayos, control de la esterilidad y aptitud de los medios de cultivo) y de la utilización de controles positivos y negativo. De esta manera el laboratorio controla la variabilidad durante el ensayo (entre analistas y entre equipos o materiales involucrados en el ensayo).

En el caso de un laboratorio forense que realiza pruebas de rutina, se debe tener en cuenta que para el procesamiento de una muestra por PCR, debido a la alta sensibilidad de esta prueba, el requisito más importante es evitar la contaminación. Para ello, el laboratorio debe tener tres áreas de trabajo separadas: sala de extracción de ADN, sala de preparación de mezcla de reactivos y sala de PCR (Schneider, 2007).

En cuanto a los controles de calidad externos (ensayos de aptitud o ensayos inter-laboratorios), la participación de un laboratorio forense en un programa de pruebas de competencia es esencial en un programa de calidad. Los ensayos de aptitud sirven para demostrar periódicamente el funcionamiento de la calidad del laboratorio (Budowle et al., 2005). La participación en tales actividades es uno de los mecanismos utilizados por el propio laboratorio y por el OAA para asegurar la calidad de los resultados y para la demostración de la competencia técnica (OAA, CE-LE-01).

Con una prueba de competencia abierta, el laboratorio y su personal es consciente de que se están probando, pero no son conscientes de los resultados de tipificación de ADN; ya que son ciegos con respecto a los resultados. Las muestras se analizan e interpretan de acuerdo con el protocolo aprobado por el laboratorio (validación).

Se define como validación la confirmación de los resultados obtenidos por una determinada técnica, mediante la provisión de evidencia objetiva, de que se cumplieron requisitos particulares para un uso pretendido y específico (Trullols et al. 2004). Es un proceso por el que se evalúa un procedimiento para determinar su eficacia y fiabilidad y para determinar los límites operacionales de la técnica; los estudios incluyen sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, precisión, exactitud y análisis de muestras acorde con las intenciones de uso del ensayo (Budowle et al., 2005).

Las pruebas de competencia abierta deben realizarse al menos una vez al año. Los laboratorios deben tener y mantener la documentación

adecuada y, si se producen errores, deben contar con políticas y prácticas para la acción correctiva (Budowle et al., 2005).

10.3. Entidades científicas y asociaciones dedicadas a la genética forense humana y no humana a nivel internacional y en Argentina

En Argentina y a nivel internacional diferentes asociaciones científicas se encuentran abocadas a la genética forense humana y no humana. Así es el caso de la Sociedad Internacional de Ciencias Forenses (ISFG) y la Sociedad Argentina de Genética Forense (SAGF). Particularmente en genética forense no humana, cumplen un rol preponderante la Asociación Internacional de Genética Animal con su comité de forense animal (ISAG), y la Sociedad Forense de la Vida Silvestre (SWGWILD).

En estas asociaciones se discuten diferentes temas de interés de la genética forense humana y no-humana, siendo los de mayor relevancia el desarrollo y mejoramiento de los métodos de genotipificación, las bases de datos para los diferentes tipos de marcadores en distintas especies, la descripción de casos de aplicación, los mecanismos de colaboración interlaboratorio (Proficiency Test vs. Comparison Test), las recomendaciones para la estandarización de laboratorios dedicados a la genética forense no-humana (acreditación/certificación), entre otros. Con respecto a los dos últimos puntos, cabe destacar los esfuerzos realizados con el fin de proponer listas de recomendaciones para los laboratorios dedicados a la genética forense animal (Budowle et al., 2005). Por su parte, el ISFG recomienda que los laboratorios que tienen como objetivo llevar a cabo las pruebas de forma rutinaria deberían considerar la acreditación a la norma ISO17025 (Morlinga et.al.2002), así como la validación de los métodos de genotipificación y la estandarización de las nomenclaturas. La Asociación Forense para la Vida Silvestre describe los códigos de ética para promover los más altos

estándares de conducta profesional y personal entre sus miembros y afiliados (<http://www.wildlifeforensicscience.org/mission/ethical-guidelines/>).

10.4. Laboratorios forenses no humanos en Argentina

En nuestro país existen prestigiosos laboratorios de investigación y servicio que realizan estudios en genética animal tanto en animales domésticos como silvestres. Entre ellos, el Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGE-VET, UNLP-CONICET) es reconocido por la Sociedad Argentina de Genética Forense.

El IGE-VET se encuentra en la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y desarrolla desde los años '60 investigaciones en genética animal. En el marco de un Servicio Externo creado en año 1994, “Servicio de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos” (GAD-UNLP) se realizan estudios de variabilidad genética de especies domésticas (bovinos, equinos, ovinos y caninos) mediante técnicas genéticas, genómicas y transcriptómicas para resolver problemáticas en el área de las ciencias veterinarias. Se realizan diagnósticos de identificación individual, filiación y casos de abigeato en bovinos y equinos mediante marcadores de ADN del tipo microsátélites. Recientemente se han implementado métodos de identificación genética en caninos y ovinos. El GAD participa desde 1996 en el Test de Comparación Internacional organizado por la ISAG para la estandarización de los sistemas de tipificación y certificación de los laboratorios de diagnóstico genético animal. Desde el año 2004 se realiza la identificación especie-específica de muestras biológicas con el fin de certificar la composición de alimentos (quesos, alimentos balanceados, harinas de origen animal) y para resolver casos de fraudes, adulteraciones y contaminaciones (casos de dopaje positivo en caballos de carrera) para el Poder Judicial y para empresas privadas.

10.5 Bibliografía

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS) Instituto de Salud Carlos III Ministerio de Sanidad y Consumo Plaza Luis M, Albert A (2007) “Directrices de la OECD para la gestión de la calidad de los estudios genéticos moleculares” Madrid. Disponible en:

[http:// www.oecd.org/science/biotech/40931429.pdf](http://www.oecd.org/science/biotech/40931429.pdf)

Asociación Forense para la vida silvestre. Códigos de ética Disponible en: <http://www.wildlifeforensicscience.org/mission/ethical-guidelines/>

Asociación Internacional de Genética Animal (ISAG) Disponible en:

[http:// www.isag.us/](http://www.isag.us/)

Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., Van Haeringen, W., Fain, S., Broad, T. (2005) “Recommendations for animal DNA forensic and identity testing”. *Int J Legal Med*, 119: pp. 295–302.

Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) (2008) “La Aplicación de los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)”. CI-ENAC-BPL Rev. 2. Disponible en: <http://www.enac.es/documents/7020/2625ec52-273a-4a3e-a58d-f4777b699684>

Escobar Carmona, E., Ibargollín Ulloa, R., Oriol, M., Echemendía, O. (2009) “Implementación del Sistema de Gestión de la Calidad en Laboratorios Clínicos de la provincia Sancti-Spíritus”. *Gaceta Médica Espirituana Sup* – 2009 11(1).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2002) “Manual de Capacitación - Certificación de Calidad de los Alimentos Orientada a Sellos de Atributos de Valor en Países de América Latina”. Disponible en: [http:// www.fao.org/docrep/004/ad094s/ad094s00.HTM](http://www.fao.org/docrep/004/ad094s/ad094s00.HTM)

International Accreditation Forum (IAF) (1999) “Guía IAF para la implementación de la guía ISO/CEI 65: 1996, Requisitos generales relativos a los organismos que proceden a la certificación de productos”
International Organization for Standardization (ISO) (2005) “ISO 9000: 2005 Sistemas de Gestión de la Calidad. Fundamentos y vocabulario“

(Traducción certificada) Disponible en: http://www.uco.es/sae/archivo/normativa/ISO_9000_2005.pdf

International Organization for Standardization (ISO) (2006) "Organismos Nacionales de Normalización en Países en desarrollo" Disponible en: www.iso.org/iso/fast_forward-es.pdf

International Organization for Standardization (ISO) (2010) "Normas Internacionales y Normas privadas" Disponible en: [http://](http://www.iso.or)

- www.iso.or

Morlinga, N., Allenb, R., Carracedoc, A., Geadad, H., Guidete, F., Hallenberga, C., Wolfgang, M., Wolfgang, R., Mayrg, Olaisenb B., Pascali, V., Schneider, P. (2002) "Paternity testing commission of the international society of forensic genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases". *Forensic Science International* 129 (2002) pp. 148–157

Organismo Argentino de Acreditación (OAA) CE-LE-01: Política y Criterios para la participación en Ensayos de Aptitud / Comparaciones Interlaboratorios. Disponible en: <http://www.metroquimica.com.ar/.../GUIA%20PARA%20VALIDACION%20D...>

Prieto, L., Zimmermann, B., Goios, C., Rodriguez-Monge, A., Paneto, D., Alves, C., Alonso, E., Fridman, F., Cardoso, G., Lima, H., Anjos, I., Whittle, J., Montesino, A., Cicarelli, D., Rocha, C., Albarra'n, E., Pancorbo, G., Pinheiro, H., Carvalho, I., Sumita, J., Parson, B. (2011) "The GHEP–EMPOP collaboration on mtDNA population data—A new resource for forensic casework" *Forensic Science International: Genetics* 5, 146–151.

Real Academia de la Lengua Española. Diccionario Oficial de la Lengua Española. (2004) Madrid. Disponible en: <http://www.rae.es/>

Schneider, P. (2007) "Scientific standards for studies in forensic genetics". *Forensic Science International*, 165: 238–243.

Sociedad Internacional de Ciencias Forenses (ISFG) Disponible en: <http://www.isfg.org>

Sociedad Argentina de Genética Forense (SAGF) Disponible en: <http://www.sagf.org.ar/>

Sociedad Forense de la vida Silvestre (SWGILD) Disponible en: <http://www.wildlifeforensicscience.org/mission/ethical-guidelines/>

Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, X. (2004) "Validation of qualitative analytical methods". Trends Analyt Chem; 23: 137 - 45.

LOS AUTORES

Pilar Peral García. Licenciada en Biología (FCNyM, UNLP, año 1982), Doctora en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 1994), Especialista en Gestión Universitaria (Escuela de Posgrado, UNMdP), Profesora Titular de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Investigadora Principal de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Guillermo Giovambattista. Licenciado en Biología (FCNyM, UNLP, año 1989), Doctor en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 1996), Profesor Adjunto de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Investigador Principal de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

María Verónica Ripoli. Licenciada en Biología (FCNyM, UNLP, año 1995), Doctora en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 2001), Magister en Biología Molecular e Ingeniería Genética (Universidad Dr. René Favaloro, año 2001), Investigadora Adjunta de la Carrera de Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Laura S. Barrientos. Médica Veterinaria (FCV, UNLP, año 2010), Docente de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Becaria Doctoral del Consejo Nacional de

Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Nora Lía Padola. Médico Veterinario (FCV, UNCPBA, año 1998), Doctor en Ciencia Animal (FCV, UNCPBA, año 2004), Profesor Asociado de los cursos de grado de Inmunología Básica y Especial y Profesor Invitado del curso de postgrado de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, Investigador Adjunto de la Carrera del Investigador de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). Lugar de trabajo: Laboratorio de ADN (FCV, UNCPBA), CIVETAN (Centro de Investigaciones Veterinarias Tandil, CONICET, CICPBA, FCV, UNCPBA).

Ana Victoria Bustamante. Licenciado en Biología (FCNyM, UNLP, año 1998), Doctor en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 2006), Profesor Invitado del curso de postgrado de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA, Investigador Adjunto de la Carrera de Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: Laboratorio de ADN (FCV, UNCPBA), CIVETAN (Centro de Investigaciones Veterinarias Tandil, CONICET, CICPBA, FCV, UNCPBA).

Analía Inés Margheritis. Bioquímica (UNLP, año 1998), Jefe de Trabajos Prácticos cátedra de Química General e Inorgánica de la Facultad de Agronomía de la UNCPBA. Responsable del Instituto de Investigación Criminal y Ciencias Forenses Departamento Judicial Azul. MP SCJPBA. Lugar de trabajo: Fiscalía General de Azul y Laboratorio de Química de la FAA UNCPBA

Egle E. Villegas Castagnasso. Licenciada en Biología (FCNyM, UNLP, año 1997), Doctora en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 2005), Jefe de Trabajos Prácticos de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP; Profesional Adjunto de la Carrera del Personal de Apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de Trabajo: Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata (IGEVEVET).

Elina Francisco. Licenciada en Genética, (FCEQyN, UNaM, 2005), Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV, UNLP, año 2014), Ayudante Diplomado de la Cátedra Antropología Biológica III (FCNyM, UNLP). Responsable del Laboratorio de Genética Forense perteneciente al Instituto de Investigación Criminal y Ciencias Forenses Norte, Ministerio Público-Procuración General de la Suprema Corte de Justicia. Junín, provincia de Buenos Aires.

Silvina Díaz. Licenciada en Genética (FCEQyN, UNaM, año 1997), Doctora en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 2003), Profesora Adjunta de los cursos de Genética Microbiana y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Investigadora Adjunta de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Julián Alejandro Crespi. Licenciado en Biología (FCNyM, UNLP, año 2007), Docente de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Profesional Asistente de la Carrera del Personal de Apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Claudia M. Corbi Botto. Licenciada en Bioquímica (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, año 2009), Docente del curso de Genética General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Becaria Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Daniel Estanislao Goszczynski. Licenciado en Biotecnología (UNQ, año 2010), Docente de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Becario Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

María Elena Fernández. Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular (FCE, UNLP, año 2010), Docente de los cursos de Genética Microbiana y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Becaria Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Juan Pedro Lirón. Licenciado en Genética (FCEyN, UNMan, año 1999), Doctor en Ciencias Naturales (FCNyM, UNLP, año 2004), Jefe de Trabajos Prácticos de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, Investigador Adjunto de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Diego Manuel Posik. Licenciado en Biología (FCNyM, UNLP, año 1991), Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (FCE, UNLP, año 2004), Profesor Adjunto de Biología (FCE, UNLP) y Genética Veterinaria Forense (FCV, UNLP), Profesional Principal de la Carrera de Personal de Apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Denise Aparecida Andrade de Oliveira. Licenciada en Ciencias Biológicas (PUC/MG, año 1983), Magister en Zootecnia (EV-UFMG, año 1989), Doctora en Ciencia Animal (EV-UFMG, 1994), investigador post-doctoral en Inmunogenética y Genética Molecular (Stormont Laboratories Inc., California-USA, 1997), Profesora Asociada de los cursos de Medicina Veterinaria (disciplina Mejoramiento Animal) y Acuicultura (Genética Aplicada à Acuicultura). Lugar de Trabajo: Escuela de Veterinaria da Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte Minas Gerais, Brasil.

Marcela Gonçalves Drummond. Licenciada en Biología (Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil - UFMG, 2004), Magister en Genética (UFMG, 2006) y Doctora en Bioquímica e Inmunología (UFMG, 2010). Investigador post-doctoral en Genética Molecular (2010 - 2014 – UFMG y Myleus Biotechnology). Directora Ejecutiva de la empresa Myleus Biotechnology desde 2010.

Lissandra Sousa Dalsecco. Licenciada en Medicina Veterinaria (Universidad Federal de Minas Gerais/Brasil - UFMG, 2010), Doctora en Zootecnia – Genética y Mejoramiento Animal (UFMG, 2013), doctorando en Zootecnia, Genética y Mejoramiento Animal (UFMG) e becaria en Desenvolvimento Tecnológico e Industrial (DTI B, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/Brasil, desde 2014). Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética, Facultad de Veterinaria, UFMG.

Danilo Alves Pimenta Neto. Licenciado en Biología y en Gestión Ambiental (Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC-MG/Brasil, 2010), Magister en Zootecnia, Genética y Mejoramiento Animal (Universidad Federal de Minas Gerais - UFMG/Brasil, 2013), doctorando en Zootecnia, Genética y Mejoramiento Animal (UFMG). Analista en el Laboratorio de Genética Animal, Facultad de Veterinaria, UFMG.

Rafael Melo Palhares. Licenciado en Biología (Universidad Federal de Minas Gerais – UFMG/Brasil, 2008), Magister en Microbiología (UFMG, 2011), doctorando en Genética (UFMG). Socio y Director Técnico Científico en Myleus Biotechnology (Brasil, desde 2010).

Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil. Licenciado en Biología (Universidad Federal de Minas Gerais (Brasil, UFMG, año 2004), Magister en Microbiología (UFMG, año 2006) y Doctora en Microbiología (UFMG, año 2010). Investigadora de la Empresa Brasileira de Investigaciones Agropecuarias (EMBRAPA, Brasil). Profesora del Programa de Pos-grado en Biotecnología de la Universidad Federal de Tocantins (UFT, Brasil). Socio y Consejero Científico de la empresa Myleus Blotechnology (Brasil, desde 2010).

Andrés Rogberg Muñoz. Bioquímico (FCE, UNLP, año 2005), Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (FCE, UNLP, año 2011), Jefe de Trabajos Prácticos de los cursos de Genética General y Genética Veterinaria Forense, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) y del curso de Mejoramiento Genético Facultad de Agronomía (UBA), Investigador Asistente de la Carrera de Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata) y Departamento de Producción (FA, UBA).

Agustín H. Falomir Lockhart. Licenciado en Biotecnología y Biología Molecular (FCE, UNLP, año 2013). Docente en la Cátedra de Introducción a la

Química y Química General de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Becario Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

María Eugenia D'amato. Licenciada en Biología (FCNyM, UNLP, año 1989). Doctora de la Universidad de Buenos Aires (FFyB, UBA, año 1996). Profesora Asociada de la Universidad de Western Cape (UWC, South Africa). Lugar de trabajo: Forensic DNA Laboratory (FDL), Departamento de Biotecnología de Western Cape (Cape Town, Sud África).

Virginia Aliverti. Médica Veterinaria (FCV, UNLP, año 1982). Magister en Tecnología e Higiene de Alimentos (FCV, UNLP). Jefe de Trabajos Prácticos de los cursos de Tecnología y Bromatología de Alimentos (FCV, UNLP). Técnica de la Carrera del Personal de Apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Lugar de trabajo: IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria-UNLP-Conicet La Plata).

Genética forense no-humana /

Pilar Peral García ... [et.al.] ; compilado por Pilar Peral García ; Guillermo Giovambattista ; María Verónica Ripoli. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2014.
E-Book.

ISBN 978-950-34-1181-0

1. Genética. I. Peral García, Pilar II. Peral García, Pilar, comp. III. Giovambattista, Guillermo, comp. IV. Ripoli, María Verónica , comp.
CDD 576.5

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA