



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

ESPECIALIDAD EN MEDICINA FORENSE

“Uso de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico”

**TESIS QUE PARA OBTENER EL ELDIPLOMA
DE ESPECIALIDAD EN MEDICINA FORENSE**

PRESENTA:

SUGEILY MARTÍNEZ RESÉNDIZ

DIRECTOR DE TESIS

M EN C. EVANGELINA MUÑOZ SORIA

ESP. MACARIO SUSANO POMPEYO

México Distrito Federal; enero de 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de noviembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina para examinar la tesis de titulada:

“Uso de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico”

Presentada por el alumno:

Martínez

Apellido paterno

Resendiz

Apellido materno

Sugeily

Nombre(s)

Con registro:

A	0	7	0	1	5	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

ESPECIALIDAD EN MEDICINA FORENSE


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

M. en C.  Evangelina Muñoz Soria

Director de tesis

 Esp. Macario Susano Pompeyo


 Dr. Eleazar Lara Padilla

 Dr. José Correa Basurto

 Esp. Augusto Pedro García Gutiérrez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

 Dr. Eleazar Lara Padilla


 ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
 I. P. N.
 SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 12 del mes diciembre del año 2007, la que suscribe **Sugeily Martínez Resendiz** alumna del Programa de Especialidad en Medicina Forense con número de registro A070150, adscrita a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **M. en C. Evangelina Muñoz Soria** y **Esp. Macario Susano Pompeyo** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Uso de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección su.resendiz@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Sugeily Martínez Resendiz

Nombre y firma

Uso de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico

AGRADECIMIENTOS

**A cada uno de mis maestros por haber compartido sus conocimientos. . .
gracias.**

INDICE

Titulo

Acta de registro de tema de tesis y designación de Director

Acta de Revisión de tesis

Agradecimientos

Índice

Glosario

Abreviaturas

Resumen

Abstrac

Introducción

Antecedentes

- Datos Históricos
- Estructura del ADN
- Reacción en Cadena de Polimerasa
- Cambios cadavéricos
- Uso de muestras de ADN en Medicina Forense
- Contaminación de las muestras
- Procedimiento Normalizado de operación

Justificación

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

- Procedimiento Normalizado de Operación para la toma conservación y traslado de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico

Discusión

Conclusión

Bibliografía

GLOSARIO

Muestra: Parte o porción extraída de un conjunto por métodos que permiten considerarla como representativa de él.

Tejido: Entidad morfológica compuesta por la agrupación de células de la misma naturaleza, ordenadas con regularidad y que desempeñan una misma función

Órgano: entidad morfológica compuesta por la agrupación de tejidos que concurren al desempeño del mismo trabajo fisiológico

Cadáver: el cuerpo humano en el que se haya comprobado la pérdida de la vida

Víscera: un órgano contenido en una cavidad esplácnica.

Conservación: Acción de conservar; es decir, preservar de la alteración.

Traslado: Llevar a alguien o algo de un lugar a otro.

Material: Elementos agrupados en un conjunto el cual es, o puede ser, usado con algún fin específico

Génico: Material bioquímico, resultado de la expresión de un gen

Procesamiento: Someter datos o materiales a una serie de operaciones programadas.

Uso: Empleo continuado y habitual de alguien o algo

ABREVIATURAS

A: Adenina

ADN: Acido Desoxirribonucleico

ATP: Adenosín Trifosfato

C: Citonina

CNPJ: Comité de Servicios Periciales de la Conferencia Nacional de Procuración de Justicia

dNTPs : Deoxinucleótidos trifosfato

FBI: Oficina Federal de Investigación (en inglés: Federal Bureau of Investigation)

G: Guanina

MLP: sondas multilocus

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PNO: Procedimiento normalizado de operación

RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

SEMEFO: Servicio Médico Forense

RESUMEN

Actualmente la tecnología del ADN ha superado con creces muchas otras técnicas en la investigación de la identificación humana, sin embargo, es fundamental el conocer la versatilidad de ésta tecnología moderna. Una de las fases fundamentales, es sin duda alguna, la obtención del material biológico a emplearse para esta investigación, existen diversos criterios para la obtención de muestras biológicas destinadas a este efecto, es por lo tanto el objetivo de esta investigación, el unificar esos criterios y proponer un procedimiento normalizado de operación para la toma, conservación y traslado de muestras de tejido de cadáver sobre las que se puede realizar este estudio.

ABSTRAC

Nowadays the technology of the ADN has overcome fully many other technologies' in the investigation of the human identification, nevertheless, is fundamental to know the versatility about this one modern technology. One of the fundamental phases, it is undoubtedly some, the obtaining of the biological material to be using for this investigation, diverse criteria exist for the obtaining of biological samples destined for this effect, it is therefore the aim of this investigation, to unify these criteria and to propose a procedure normalized of operation for the capture, conservation and movement of samples of tissues of corpse about it's possible to realize this study.

INTRODUCCIÓN

La identificación humana es una de las vertientes fundamentales de la medicina forense que se ha enriquecido en los últimos años con los aportes que los métodos de investigación en genética molecular le han proporcionado, tales son las técnicas de tipificación de ADN, análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), técnicas de Southern-blotting, amplificación por PCR y secuenciación del ADN mitocondrial, éstas forman parte relevante de dicha metodología, las cuales permiten la investigación de identidad en el marco médico legal. ⁽¹⁾

La validez y reproductibilidad de los resultados de la extracción adecuada de ADN es indiscutible, siempre y cuando los análisis se realicen en las condiciones que minimicen la posibilidad de contaminación por parte del personal encargado de la obtención de la muestra, o del desarrollo de microorganismos típicos del proceso de putrefacción, así como de productos químicos que hayan estado en contacto con el cadáver y que se utilicen los controles adecuados como la utilización del material de protección, el uso de los materiales de embalaje adecuados, así como evitar que se destruyan o modifiquen por condiciones ajenas al proceso de conservación y traslado con base en las recomendaciones establecidas en las Normas de Bioseguridad, Sanitarias y Jurídicas Nacionales e Internacionales, respecto a utilidad de las muestras de tejidos para los fines legales.

Cuando una muestra biológica no es obtenida, conservada, trasladada o procesada de forma correcta es posible que el análisis sobre dicha muestra no sea factible, desperdiciando de este modo: tiempo, recursos humanos y económicos.

Por lo que es fundamental que el Médico Forense y el personal a cargo del manejo de la muestra conozcan cada uno de los aspectos que involucran los procedimientos correctos de obtención, conservación, traslado y procesamiento de la muestra, de forma correcta, para no incurrir en errores y la muestra obtenida sea satisfactoria para la extracción de ADN en el laboratorio de genética.

De acuerdo a las condiciones físicas en las que se encuentre el cadáver y el tipo de delito con el cual se encuentre relacionado, será el tipo de muestra que se obtenga para su estudio.

La presente investigación tiene por objeto ofrecer una propuesta de procedimientos normalizados de operación para la recolección, conservación, traslado y procesamiento de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material genético” de acuerdo a las necesidades actuales del Servicio Médico Forense del Distrito Federal.

ANTECEDENTES

DATOS HISTORICOS

En 1953 James Watson y Francis Crick describieron la estructura en doble hélice de la molécula de ADN, informaron su hallazgo en un breve artículo publicado en las páginas 737 y 738 de la revista Nature titulado: 'Estructura molecular de los ácidos nucleicos'. (3)

En 1985, Jeffreys y cols describieron un método de identificación individual que denominaron "DNA fingerprinting" o huella genética en Inglaterra. (2)

En 1987, el uso de la denominada huella genética había sido admitido en procesos penales en Inglaterra y E.E.U.U. y en 1988 el Ministerio del interior británico, así como el de Asuntos Exteriores y la Commonwealth, ratificaron el uso de esta técnica para la resolución de casos de inmigración en las que hubiera que dilucidar la existencia o no de relaciones familiares. (4)

En 1990, el U.S. Congress Office of Technology Assessment concluye que la identificación de individuos basada en las pruebas de ADN es científicamente válida, siempre y cuando se utilizase la tecnología apropiada y se mantuviese un riguroso control de calidad.

En 1992 el US National Research Council confirma con contundencia la validez de las técnicas de identificación individual basadas en las pruebas del ADN y establecía unas guías de actuación (5,6)

La estandarización de las mismas ha sido encarada, entre otros, por los laboratorios del FBI (FBI Academy, Quántico, 1989).

En 1997 surge el programa Fénix de Identificación Genética de personas desaparecidas en Granada, España que fue pionera en el mundo en la creación de una base de datos genética de personas desaparecidas.(3)

Actualmente se puede afirmar que la prueba del ADN está consolidada científicamente y su valor ante los tribunales no deja lugar a dudas. Para estudiar los problemas de aplicación forense de nuevos polimorfismos ADN, con el ánimo de estandarizar procedimientos y establecer un riguroso control de calidad surgieron la

Technical Working Group on DNA Analysis y Methods en EE.UU y la European ADN Profiling Group en Europa.⁽⁷⁾

El 18 de octubre del año 2002 en la ciudad de México D.F., fue instalado el Comité Nacional de Genética Forense, en atención a las disposiciones del Comité de Servicios Periciales de la Conferencia Nacional de Procuración de Justicia (CNPJ).

En virtud de que la genética forense es actualmente la técnica más confiable para lograr la identificación humana cuando no se cuenta con huellas dactilares, se coincidió en la importancia de crear un protocolo que instruya la toma de muestras biológicas en todas las procuradurías del país para homologar las técnicas.

El “manual para el levantamiento, embalaje y traslado de indicios y muestras de referencia de origen biológico” fue elaborado en agosto del 2003 en la Dirección General de Coordinación de Servicios Periciales en la que participaron 14 procuradurías de la República Mexicana y 41 peritos, mismo que no ha sido modificado hasta la fecha. Y no es específico para la obtención, traslado y conservación de muestras de tejido para extracción de ADN.

ESTRUCTURA DEL ADN

El ADN es un polímero constituido por un limitado número de monómeros. Los monómeros son nucleótidos que consisten en una base nitrogenada, un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato.

Las bases nitrogenadas son las purinas: adenina (A) y guanina (G) y las pirimidinas timina (T) y citosina(C). Los nucleótidos están ligados por medio de enlaces fosfodiéster formando una cadena de la que protruyen las bases que se emparejan con las bases de otra cadena nucleotídica por medio de puentes de hidrógeno. La adenina y la timina siempre se reconocen y se unen de forma específica lo mismo que ocurre entre la guanina y la citosina. De tal manera que la secuencia de bases de una cadena de ADN determina siempre la de su cadena complementaria.

La exposición a determinadas temperaturas o a un ambiente alcalino provoca la abolición de los puentes de hidrógeno entre las bases y la separación de las hebras de ADN. Esta situación es reversible, y cuando cesan esas condiciones, se vuelve a

establecer de nuevo la asociación entre las cadenas que se unen otra vez según el principio de la complementariedad entre sus bases.

En una hebra de ADN pueden existir una enorme cantidad de secuencias nucleotídicas diferentes.

La cantidad total de material genético del ser humano consiste en 3 billones de nucleótidos, aproximadamente. En este ADN existe información para un total estimado de unos 100,000 genes, que constituyen solo entre un 5 y un 10% del genoma.

El ADN expresivo o codificante, posee poca variabilidad entre las personas, con excepción de ciertas regiones, como la que informa para el sistema HLA . El ADN no expresivo es polimórfico y variable entre los individuos, por lo que posee una utilidad extraordinaria en Medicina Legal, además tiene la ventaja de representar la mayor parte del genoma humano.

Se estima que aproximadamente la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo y, aunque gran parte del mismo es extremadamente polimórfico por diversos motivos, el ADN más utilizado con fines forenses hasta la fecha es el ADN repetido en tándem y, dentro de el, el ADN minisatélite y microsatélite

La variabilidad genética observable en el ADN de los distintos individuos se puede investigar experimentalmente por diversos procedimientos. En Genética Forense los más habituales pueden clasificarse en dos grupos desde la perspectiva histórica. Estos son: procedimientos clásicos o de análisis por sondas multilocus (MLP) y unilocus (SLP) (DNA fingerprinting y DNA Profiling, respectivamente) y procedimientos basados en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa.⁽⁷⁾

REACCION EN CADENA DE POLIMERASA

La secuenciación (habitualmente directa de productos de PCR) detecta toda la variabilidad y es el procedimiento más utilizado actualmente ⁽⁸⁾

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis ^{,15} cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un

fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias, causante de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas

El proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción

Inicialización:

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C (ó 98°C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

Desnaturalización:

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

Alineamiento/Unión del cebador:

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 50-65°C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

Extensión/Elongación de la cadena:

Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80°C (comúnmente 72°C). El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla básica: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto.

Elongación Final:

Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

Conservación:

Este paso se lleva a cabo a 4-15°C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo.

La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 0.2-0.5 ml, en pequeños tubos de 15-100 µl que se colocan en el termociclador.

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de

acuerdo a su carga, esto es, longitud, y, en menor medida y dependiendo de la matriz empleada, a su tamaño: típicamente se emplean la electroforesis en gel de agarosa, para fragmentos grandes; en acrilamida, para los más pequeños; y, de forma más rápida y aplicable a la PCR asociada a marcaje fluorescente, la electroforesis capilar.¹⁴ El/los tamaño/s de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de peso molecular de ADN, el cual contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido, y que se corre en el gel junto con los productos de PCR.

La relativa estabilidad de ADN permite que, aunque fragmentado, se conserve durante largos periodos de tiempo si las condiciones son propicias.¹³ En ocasiones las muestras intactas con las que se puede contar son extraordinariamente pequeñas o están deterioradas. La PCR soluciona ambos problemas y proporciona cantidades útiles para posteriores pasos de análisis. En primer lugar aumenta la cantidad de material recuperado a partir de muestras escasas. También debido a la naturaleza de la técnica y su propósito de amplificación de fragmentos pequeños, esta fragmentación no impide que este ADN pueda ser empleado como molde para una reacción de PCR.

En la práctica, la PCR puede fallar por varias razones, pero normalmente es debido a su sensibilidad a la contaminación, que a veces provoca la amplificación de ADN "falso". Por esto, se han desarrollado un gran número de técnicas y procesos para optimizar la PCR:

- La contaminación con ADNs extraños puede solucionarse con protocolos y procedimientos que separen las reacciones pre-PCR de los contaminantes potenciales del ADN. Esto normalmente implica la separación espacial de las áreas de realización de la PCR de las de análisis o purificación de los productos de PCR, y la limpieza exhaustiva de la superficie de trabajo entre la realización de una PCR y la siguiente.
- Las técnicas de diseño de primers son importantes en la mejora de la obtención de productos de PCR y en evitar la formación de productos falsos, y el uso de componentes alternativos para los buffers o las enzimas polimerasas

pueden ayudar en la amplificación de regiones de ADN largas o, de cualquier otra forma, problemáticas.

El poder de la amplificación con PCR es tan alto que los más pequeños contaminantes pueden dar resultados falsos positivos, por lo que el material y las soluciones a emplear deben ser escrupulosamente controlados ⁽¹²⁾

CAMBIOS CADAVERÍCOS

AUTOLISIS

Denominamos autolisis al conjunto de procesos fermentativos anaeróbicos que tienen lugar en el interior de la célula por la acción de las propias enzimas celulares, sin intervención bacteriana.

Es el más precoz de los procesos transformativos cadavéricos, siendo sucedido posteriormente por la putrefacción; a menudo, los fenómenos autolíticos y putrefactivos se superponen en su evolución.

Desde un punto de vista estructural, la autolisis es una necrosis celular, muy semejante en su esencia a la que ocurre en el vivo cuando un órgano sufre alteraciones isquémicas o atóxicas de suficiente entidad. Las enzimas responsables de la autolisis proceden de los lisosomas; estos organelos, en la célula viva, se caracterizan por la impermeabilidad de su membrana. Si esta propiedad sufre un deterioro tiene lugar el paso al citoplasma de las enzimas que contienen, originándose la digestión de la propia célula.

En este proceso, SCHRYVER y DE LAUNAY distinguieron dos etapas: una ultravital o período latente. En el que las alteraciones se limitan al citoplasma celular, quedando inalterado el núcleo, y otro período anárquico o de muerte confirmada, en el que el núcleo presenta una hipercromatosis (picnosis) inicial, seguida de una hipocromatosis o decoloración. A estos dos períodos seguiría, finalmente, un tercer período de cromatólisis o desaparición del núcleo. MULLER y cols., mucho más recientemente, observan un primer período, que comprende sólo unas horas, en el que tiene lugar la desaparición de las mitocondrias y la fragmentación de la reticulina; en un segundo período, que corresponde a los 3 ó 4 primeros días post mortem, tienen lugar las alteraciones celulares sin afectarse el núcleo; mientras que cuando la autolisis afecta al núcleo y se va fraguando la desaparición de la morfología celular, la autolisis tiene una duración de más de 4 días. SIEGEL ha estudiado sistemáticamente las alteraciones ultra estructurales de la célula después de la muerte con la ayuda del microscopio electrónico; sus resultados son los siguientes:

1. La continuidad del retículo granular se rompe casi inmediatamente después de la muerte.
2. El retículo endoplásmico granular se muestra más resistente, observándose intacto después de 48 horas post mortem, cuando la degradación de las mitocondrias y de otras estructuras de la membrana está ya bien avanzada.
3. Órganos, como el hígado y el riñón, extraídos 3 horas después de la muerte a la temperatura ordinaria, apenas muestran diferencias en su estructura histológica con respecto a órganos fijados inmediatamente después de la muerte (tales resultados sugieren que para muchos tejidos no hay tanta urgencia para la fijación como se viene admitiendo).
4. Intervalos de tiempos ulteriores, 4 a 6 horas, el sarcoplasma y el retículo granular presentan ya cambios regresivos y las mitocondrias se hinchan adquiriendo forma redondeada. A las 10 horas las mitocondrias están dilatadas y netamente alteradas a nivel de la estructura interna, pese a lo cual conservan un 50 % de su actividad succinoxidásica.

La córnea, tejido desprovisto de vasos, escapa a estas alteraciones precoces, I. Si se extrae del cadáver precozmente y se conserva en un refrigerador a 4 °C, puede ser utilizable con fines de injerto durante bastantes días.

Desde el punto de vista bioquímico la autólisis consiste en un proceso de demolición molecular de los elementos orgánicos existentes en la célula por la intervención de los fermentos o enzimas celulares. BORRI, en su día, dividía las enzimas que intervienen en estos fenómenos en dos grupos: hidratas (enzimas de hidratación-deshidratación) y óxido-reductasas (enzimas de oxidación -reducción), división que no necesita ser modificada.

Al cabo de un tiempo de evolución del proceso o las enzimas pueden llegar a actuar sobre sí mismas, destruyéndose, con lo que terminaría el proceso para ser sustituido por la putrefacción.

LOS PROCESOS DE AUTÓLISIS

Los procesos de necrosis celular que acontecen en la autólisis producen una serie de modificaciones en los tejidos, en los órganos y también en los diversos fluidos corporales: sangre, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso y vítreo, líquido

pericárdico, sinovial, endolinfático, etc. Esa serie de alteraciones, de las cuales la citólisis es la primera y la más importante, dan lugar a una serie de modificaciones, que deben ser conocidas como fenómenos post mortem.

Son clásicas las descripciones macroscópicas producidas por la autólisis en los órganos y tejidos, pero son relativamente recientes las investigaciones sobre las alteraciones bioquímicas secundarias a la autólisis y putrefacción, lo que EVANS denominó tanatoquimia.

ALTERACIONES EN LOS TEJIDOS Y ÓRGANOS

1. Sangre. PENTILLA por medio de la microscopia de barrido se han estudiado los glóbulos rojos post mortem y se observa que a las 4 horas ya están alterados mostrando una inflamación en su periferia. A las 12-14 horas presentan puntas afiladas sobre su superficie. A los 2-3 días han desaparecido los puntos salientes y vuelven a ser esféricos y lisos. A los 4 días tienen irregularidades en su superficie en forma de valles y erupciones. A los 6-8 días se produce una agregación de los glóbulos y ya no es posible ver glóbulos aislados.

La membrana del eritrocito, que es lipóide, se altera rápidamente y se hace permeable, permitiendo la salida de elementos principalmente electrólitos, en especial el K, y hemoglobina. Esa alteración de la membrana se debe a modificaciones de los sistemas enzimáticos, de las cuales la más importante es la ATP-asa y el sistema lecitincolesterol-acil-transferasa.

La hemólisis y la hiperpotasemia son ya evidentes en las primeras horas que siguen a la muerte, e irán progresando con el tiempo, siguiendo una tendencia más o menos regular, como se verá después. La hemólisis en las primeras 2 horas sólo es evidente en el suero; después se van coloreando la íntima de los vasos y la de las válvulas cardíacas. Esta inhibición es ya evidente a partir de las 24 horas. Los vasos presentan un color rojizo nacarado y brillante.

Es evidente que cuanto con mayor rapidez se obtenga la muestra de sangre, más probabilidades habrá de encontrar hematíes intactos, lo que permitirá ensayar las técnicas directas de hemoaglutinación. La hemólisis, como todos los fenómenos autolíticos y putrefactivos, está muy influenciada por la temperatura y la causa de la

muerte. La hemólisis introducirá una serie de artefactos en todas aquellas técnicas analíticas que parten del suero o que utilizan técnicas calorimétricas.

2. Bilis. Llamam la atención en el cadáver los fenómenos de inhibición biliosa, traducidos en la coloración amarillenta o verdosa que adquieren tanto la vesícula biliar como la mucosa de la parte superior del intestino delgado, y también del estómago y del esófago cuando la bilis penetra en el estómago en sentido retrógrado. Asimismo, la piel del abdomen en la región de la vesícula biliar y los planos hísticos subyacentes, así como la cara inferior del hígado, se observan a veces teñidos de amarillo y aun adquieren una consistencia laxa y blanda.

3. Páncreas. El páncreas es, entre los órganos glandulares, el asiento más acusado de transformaciones autolíticas, que lo reblandecen y lo hacen friable, al mismo tiempo que toma una coloración rojiza por iniciarse de forma simultánea la hemólisis. En ocasiones esta autólisis comienza en focos aislados de pequeñas dimensiones y de un color blanco gris.

4. Suprarrenal. La autólisis de la suprarrenal tiene lugar muy precozmente. Se inicia en la porción medular que aparece al principio como hinchada, para fluidificarse rápidamente, hasta tal extremo que los antiguos anatomistas describieron estos órganos como de estructura hueca, razón por la que le dieron el nombre de «cápsulas suprarrenales». La capa cortical resiste mucho más.

5. Timo. El timo de los recién nacidos degenera igualmente con cierta rapidez hacia un reblandecimiento auto-lítico; pueden incluso producirse focos blandos mal delimitados que acaban constituyendo cavidades ocupadas por un líquido de color gris sucio. La ausencia de una capa celular revistiendo estas cavidades aclara su origen e impide su confusión con lesiones vitales (quistes).

6. Estómago y esófago. Los fermentos digestivos del jugo gástrico mantienen su actividad después de la muerte durante un período ordinariamente limitado a las 6 ó 7 horas inmediatas, o más raramente hasta 15 ó 24 horas. Como consecuencia de esta persistencia, la mucosa gástrica llega a ser afectada por el jugo gástrico: el fondo del estómago se pone blando, la mucosa llega a perderse en su mayor parte y el colón se hace gris sucio. Pueden encontrarse transformaciones similares del esófago por el paso del contenido gástrico, bien a consecuencia de vómitos agónicos o bien post

mortem. Genéricamente reciben el nombre de reblandecimiento ácido, en el que distinguen un reblandecimiento pardo, que toma este color por la simultánea presencia de sangre, y un reblandecimiento blanco, en el que el proceso transcurre en ausencia del pigmento hemático.

Pero, en algunas circunstancias no bien conocidas, aunque se piensa sobre todo en influencias premortales y, más concretamente, de índole cerebral, el jugo gástrico es anormalmente activo después de la muerte, con un grado de acidez muy importante, por lo que el reblandecimiento ácido puede llegar a una destrucción parcial e incluso total de parte de las paredes del estómago, corto tiempo después de la muerte. En estos casos encontramos en la autopsia un defecto mayor o menor de las paredes del estómago, con el borde blando y deshilachado, ordinariamente coloreado de pardo o negruzco.

El intestino delgado inmediato y las partes vecinas (bazo) están también reblandecidos y parduscos. En algún caso se afecta la mitad izquierda del diafragma, llegando a perforarse, con lo que el contenido gástrico se derrama en la cavidad pleural y ataca la superficie del pulmón. También puede extenderse en sentido retrógrado al esófago, cuyas paredes llegan a perforarse pasando el líquido gástrico hiperácido al mediastino posterior, que sufre los mismos cambios, y afectar desde aquí la pleura parietal y penetrar en la cavidad pleural.

7. Encéfalo. El sistema nervioso central es afectado muy precozmente después de la muerte por la autólisis, a la que hay que atribuir las primeras transformaciones y posmortales del encéfalo. Ello es especialmente llamativo en los recién nacidos y lactantes, en los que, si la autopsia se retrasa, se encuentra el cráneo ocupado por una papilla viscosa, grisácea o amarillenta, que puede hacer imposible el estudio estructural de esta víscera.

8.-Órganos Musculares. El corazón, el útero, los músculos esqueléticos son las estructuras que, habitualmente, presentan mayor resistencia a las modificaciones por autólisis.

9. Organelos. Uno de los cambios más visibles en la lesión celular post mortem es la alteración de la mitocondria. Esta llega a hincharse y en este proceso se altera

profundamente, envejece y muere, y con ello se produce una total afectación de los procesos o caída de ATP y parálisis de la respiración celular.

El otro gran fenómeno que acontece es la permeabilidad de la membrana de los lisosomas y la salida de sus enzimas proteolíticas al citoplasma. La integridad del lisosoma es una condición indispensable para que la célula viva; su alteración supone la muerte, de ahí que se la llame «suicide bag».

A estos dos fenómenos se ligarán una serie de alteraciones estructurales y bioquímicas, fundamentalmente enzimáticas, que serán las responsables del estadio final de la muerte, la llamada muerte molecular.

10. Fetos. Los fetos muertos en el claustro materno y retenidos en él sin ruptura de las membranas ovulares sufren un conjunto de transformaciones, englobadas bajo el nombre de maceración, en la que, además de la acción del ambiente líquido en que permanece sumergido el cadáver, al que embebe y disgrega, desempeña también un importante papel el proceso de la autólisis. Los fetos en este estado aparecen de un colorido rojizo, más o menos oscuro, con la epidermis exfoliada en anchos colgajos, los huesos disociados de sus uniones naturales y las partes blandas flácidas y embebidas; de suero rojizo por la hemólisis.

PUTREFACCION

La putrefacción consiste en un proceso de fermentación pútrida de origen bacteriano que pueden proceder directamente del exterior a través de boca, nariz y órganos respiratorios, pero principalmente por gérmenes existentes en el tramo intestinal, cuya flora es relativamente fija.

La putrefacción se inicia por la acción de las bacterias aerobias (*Bacillus subtilis*, *B. fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *B. Coli*) que absorben el oxígeno con gran rapidez. A continuación se desarrollan ciertos gérmenes aerobios facultativos (*B. putrificus coli*, *B. liquefaciens magnus*, *Vibrio septicus*), que acaban de consumir el oxígeno, permitiendo el desarrollo de los anaerobios, que se consideran como los de máxima acción desintegrativa.

En esta descomposición intervienen procesos de reducción y oxidación que permiten la demolición molecular, que afecta tanto las albúminas, como los

Glúcidos y los lípidos.

FASES DE LA PUTREFACCION

La putrefacción evoluciona en el cadáver en cuatro periodos o fases bien caracterizados que son:

1.- Periodo Cromático. Se inicia con el primer síntoma objetivo de la putrefacción, la mancha verde, localizada inicialmente en la fosa iliaca derecha , pero que después se extiende a todo el cuerpo . Esta primera coloración verdosa se va oscureciendo progresivamente hasta asumir un tono pardo negruzco, a veces con un matiz rojizo por la hemólisis concomitante. Este periodo que se inicia de ordinario 24 o 48 horas después de la muerte, pudiendo adelantarse o retrasarse según las condiciones ambientales e individuales, dura varios días, los limites extremos que se han descrito para su aparición oscilan entre las 14 horas y los 5 días. Ordinariamente de los 3 a los 15 días la mancha se ha extendiendo a todo el vientre e incluso a otras partes del cuerpo y a el se van añadiendo poco a poco los fenómenos de la segunda fase.

También en los órganos internos puede comprobarse la coloración verde, que en primer lugar se hace ostensible en las vísceras abdominales y, de modo especial, en el hígado.

Desde Rokitanski (1856) se sabe que la mancha verde es producida por la acción del ácido sulfhídrico, producido por la putrefacción de los tejidos, sobre la hemoglobina sanguínea en presencia del oxígeno del aire; en esta reacción se produciría sulfohemoglobina, de color verdoso en presencia de aire. Posteriormente DALLA VOLTA, comprobó que la hemoglobina solo produce derivados verdes al reaccionar con el ácido sulfhídrico si simultáneamente ejercen su acción sustancias hematinizantes o metahemoglobinizantes (clorhidrato o sulfato de hidroxilamina) que degradan parcialmente la molécula de la hemoglobina. En el Instituto de Medicina Legal de Napoles GISBERT y ROMANO comprobaron que en la reacción entre el ácido sulfhídrico y la hemoglobina se producen otros pigmentos verdes derivados de la hemoglobina y distintos a la sulfohemoglobina entre los que destaca la coeglobina . Las fases terminales de la demolición de la molécula hemoglobínica liberarían el hierro, dando lugar a la formación de sulfuro de hierro.

El papel del ácido sulfhídrico en la producción de la mancha verde es evidente y , al iniciarse los fenómenos putrefactivos en el ciego, es donde es mas abundante la flora intestinal , el lugar en el que se manifiesta primero la mancha verde es la fosa iliaca derecha.

2.- Periodo Enfisematoso. Se caracteriza por el desarrollo de gran cantidad de gases que abomban y desfiguran todas las partes del cadáver (enfisema putrefactivo) . La infiltración gaseosa invade todo el tejido celular subcutáneo; hincha la cabeza en donde los ojos presentan un acusado exorbitismo y la lengua aparece proyectada al exterior de la boca; los genitales masculinos, por la capacidad de distensión del tegumento de esta región , llegan a adquirir grandes volúmenes; el tórax y el abdomen están distendidos, dando un sonido timpánico a la percusión.

Hay otro fenómeno igualmente característico, la red venosa superficial se hace muy aparente en todas las regiones corporales; se debe a que la sangre es empujada hacia la periferia por la circulación post mortem, que se origina por un lado por la contracción del ventrículo izquierdo, consecuencia de la rigidez cadavérica, y, por otro, por la presión que los gases putrefactivos ejercen desde las cavidades esplacnicas. El resultado es que la red vascular superficial queda rellena de sangre cadavérica y se marca a través de la piel en un color rojizo debido a la trasudación e imbibición de la hemoglobina. Este periodo tiene una duración de varios días , a veces hasta un par de semanas .

3.- Fase Colicuativa

La epidermis se despega de la dermis por reblandecimiento, formándose flictenas de dimensiones variables, llenas de un líquido sanioso de color pardusco. La epidermis esta bastante bien conservada y puede desprenderse fácilmente del plano subyacente por la simple presión de los dedos, formando colgajos. El aspecto de estos colgajos y de las zonas húmedas dérmicas que dejan al descubierto tienen el aspecto de una quemadura de segundo grado. Un líquido pardo se escurre por los orificios nasales. Los apéndices cutáneos (uñas, pelos) se desprenden. La licuefacción va instaurándose.

Los gases se irán escapando y el cuerpo ira perdiendo el aspecto macrosómico que tuvo en el periodo anterior. En la cabeza los ojos se hundén, se aplastan las alas de

la nariz, se desnuda en cráneo y, mas tarde, se destruyen las partes blandas de la cara. El abdomen, que estuvo ampliamente distendido en el periodo enfisematoso, sufre soluciones de continuidad que dan una salida hacia el exterior a los gases. Todos los órganos están reblandecidos y dejan escapar una serosidad. Esta fase dura varios meses de 8 a 10 generalmente.

4.- Periodo de reducción esquelética. Paulatinamente, durante un periodo que oscila entre 2 y 3 años , hasta un máximo de 5 , todas las partes blandas del cadáver irán desapareciendo a través de su licuefacción y transformación en putrúlagos. Los elementos mas resistentes suelen ser el tejido fibroso, ligamentos y cartílagos, por lo cual el esqueleto permanece unido durante todo este periodo, aunque al final llegan a destruirse también estos elementos.

En la cabeza resisten más tiempo las mejillas y orejas, hasta que llega un momento en que solo quedan unos residuos en la región malar. La cabeza se desprende del tronco cuando desaparece los elementos de unión, lo que tiene lugar al final de este periodo.

El tórax aunque tardíamente, se deprime y se desinsertan las costillas y el esternón, que pueden llegar a separarse en sus distintas piezas. Los pulmones están sembrados de múltiples y desiguales vesículas pútridas y después se hunden en los canales raquídeo-costales, bañados en un liquido de trasudación, de color negruzco; los bronquios y la traque se reconocen durante mucho tiempo. El músculo cardiaco suele resistir considerablemente a la licuefacción.

El abdomen se deprime y no tarda en excavarse , quedando su pared unida a la columna vertebral; mas tarde queda reducido a residuos negruzcos que se fijan en las estructuras óseas vecinas . el conjunto de órganos y vísceras se va destruyendo al mismo tiempo, con diferencias en cuanto a su resistencia según su estructura: el aparato digestivo, en líneas generales, puede durar hasta mas de un año y medio después de la muerte; el bazo se destruye muy rápidamente y algo menos el hígado; el riñón esta protegido durante bastante tiempo por su celda grasa; en cuanto al útero, es sin duda, uno de los órganos mas resistentes, lo que permite establecer el sexo de un cadáver , aunque hayan desaparecido por la putrefacción los órganos genitales externos. Finalmente, todos estos órganos dejan unos restos informes,

constituidos por una materia parda oscura adherente a los lados del raquis, que recibe el nombre de putrúlagos. Todos estos restos acaban por desaparecer también, llegando así el cadáver a su total esqueletización, que estará establecida por completo después de 5 años. (9)

USO DE MUESTRAS DE ADN EN MEDICINA FORENSE

Identificación de cadáveres

La identificación del cadáver va a depender básicamente del estado del mismo o, en otras palabras, de lo que se encuentre y como se encuentre. Si el cuerpo está en unas condiciones que permitan tomar fotografías, huellas dactilares o datos odontológicos, los datos obtenidos pueden ser de gran ayuda para la identificación.

Cuando todas estas posibilidades se agotan o cuando el cadáver se encuentra reducido a huesos (a veces hasta incompleto) poco se puede hacer.

Debido a esto, a la imprecisión de los datos antropométricos clásicos, surge la necesidad de usar algo más específico, a ser posible único, que esté en todos los cadáveres y que se pueda encontrar hasta en los huesos. Ese algo es el ADN.

Estudios de la paternidad biológica

En la investigación de la paternidad se parte del presupuesto lógico siguiente: todo el ADN que una persona posee procede de una mitad de la madre y en otra mitad del padre. Para estudiar si una determinada persona es hija o hijo biológico de unos determinados padres se selecciona un locus determinado de ADN y se analiza para observar los alelos (genotipo) del hijo cuestionado. Inmediatamente se analizan los genotipos del ADN (para ver esos mismos alelos) del padre y de la madre. El hijo debe tener un alelo de la madre y otro del padre. Si presenta un alelo que no tenga el padre la paternidad se excluye con seguridad absoluta, mientras que si lo tiene, se incluye con una probabilidad estadística determinada.

Estudio de delitos contra la libertad sexual

El análisis de ADN es de importante aplicación en la presencia de delitos sexuales por la posibilidad de intercambio de indicios biológicos entre los implicados. Se realizara estudio completo con toma de muestras para obtener material génico en la presunta víctima y presunto agresor, para su posterior confronta.

Dentro de las funciones primordiales del Servicio Médico Forense se encuentra la identificación de cadáveres basada en la recopilación de datos (señas particulares) ante-mortem que efectuando el estudio comparativo con los datos pos-mortem obtiene un resultado.

En el año 2005 según el informe final SEMEFO del Distrito Federal se presentaron 1,079 cadáveres desconocidos.

Actualmente con la creación del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses del Distrito Federal se tiene contemplada la incorporación de una Sección de Genética Forense, lo que constituirá un paso significativo en la investigación de identificación de cadáveres, determinación de paternidad biológica, investigación de el probable agresor y víctima de delitos sexuales, así como la identificación en desastres masivos.

CONTAMINACION DE LAS MUESTRAS

Una muestra biológica humana es una parte del cuerpo humano separada del mismo que alberga ácidos nucleicos y que contiene la dotación genética característica de una persona. Sus características son: 1) es una parte del cuerpo; 2) está separada del mismo; 3) alberga la dotación genética característica de una persona. La muestra biológica es, pues, un soporte de datos y una parte del cuerpo.

- Contaminación por material biológico humano.: Se debe al depósito de material biológico humano sobre las muestras, con posterioridad a la toma de las mismas.
- Contaminación microbiológica: Este tipo de contaminación tiene lugar por el desarrollo de microorganismos y suele estar favorecida por la humedad y las altas temperaturas.
- Contaminación química: Se debe a la presencia de productos químicos que van a dificultar algunos de los procesos del análisis genético, fundamentalmente.

PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

Los procedimientos normalizados de operación (PNO's) son documentos que describen, con mucho detalle, las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación específica, un análisis o una acción determinada. enfocados a:

- Seguridad
- Calidad
- Eficiencia

La información que debe contener un PNO es:

Título

Objetivo

Alcance

Responsabilidad

Desarrollo del Proceso

Referencias Bibliográficas

ESTRUCTURA DE LOS PNO

Su texto debe tener un objetivo claro y preciso.

De fácil revisión.

Deben estar aprobados, firmados y fechados por personas autorizadas.

Deben ser revisados regularmente y estar actualizados.

Los PNO's deben de ser distribuidos a todos los usuarios a quienes apliquen, poniendo una copia revisada y autorizada en un registrador que no se moverá del área al cual corresponde.

El responsable (o el supervisor) deberá estar con el usuario la primera vez que se use un PNO.

BENEFICIOS DE UN PNO

- Proveen información completa y exacta para todos los procesos.
- Ayudan a asegurar que todos los procesos se lleven a cabo homogéneamente y a tiempo.

- Sirven como herramienta de inducción y capacitación para personal de nuevo ingreso.
- Pueden ser usados como lista de verificación .
- Aseguran la continuidad del proceso.
- Aseguran mejor control de calidad.
- Aseguran la exactitud de los datos recolectados.
- Aseguran adherencia a las políticas de la Institución y a la normatividad vigente

JUSTIFICACIÓN

La extracción de ADN es de vital importancia en la Medicina Forense como auxiliar de identificación de cadáveres, estudio de delitos sexuales y estudios de paternidad biológica.

Mediante un manejo adecuado de las muestras podemos obtener resultados satisfactorios al momento de la extracción de ADN

Actualmente en el Servicio Médico Forense del D.F.no existe un instrumento que norme y establezca el proceso de toma, conservación y envío adecuado de las muestras de cadáver para la obtención de material génico.

Por lo que se propone un procedimiento normalizado de operación para la correcta toma, conservación y traslado de muestras para la extracción posterior de ADN.

OBJETIVOS

Estandarizar el proceso de toma, conservación y traslado de muestras para extracción de ADN a partir de tejidos celulares obtenidos de cadáveres en diferente estado de conservación

Elaborar un procedimiento normalizado de operación para la toma conservación .y traslado de muestras de tejido de cadáver para la extracción de ADN.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio: Analítico, inductivo, descriptivo

Ubicación del estudio en espacio y tiempo: Se realizo en las instalaciones del Servicio Médico Forense del Distrito Federal, revisando el material bibliográfico existente sobre la toma, conservación y traslado de muestras de tejido de cadáver para la extracción de material génico.

Revisión bibliográfica de publicaciones científicas referidas a toma, conservación y traslado de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico.

MATERIAL

Computadora, marca COMPAQ, modelo Presario.

Sistema Operativo Windows Vista

Software Office 2000 (Word)

Libros

Cuadernillos

Manuales

Revistas

Lápiz

Bolígrafo

Marca textos

Folders

Clips

Borrador

Pizarrón

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA TOMA, TRASLADO Y CONSERVACION DE MUESTRAS DE TEJIDO DE CADAVER PARA LA EXTRACCION DE MATERIAL GENICO.

PROPOSITO

Establecer los lineamientos operativos para la toma, traslado y conservación de muestras de tejido de cadáver para la obtención de ADN, en el Servicio Médico Forense del Distrito Federal.

ALCANCE

Este procedimiento debe ser aplicado por el Servicio Médico Forense del Distrito Federal en el área de Identificación y Genética Forense.

RESPONSABILIDAD O POLÍTICAS

Es responsabilidad de los jefes de área de Identificación y Genética Forense la aplicación de este procedimiento.

APLICACIÓN

CADÁVER RECIENTE (EN ADECUADO ESTADO DE CONSERVACIÓN)

Cuando exista un cadáver reciente, o en adecuado estado de conservación, es decir sin que haya iniciado la fase de putrefacción las muestras a tomar podrán ser: muestra de sangre, muestra de tejido muscular, muestra de víscera y de pelo.

MUESTRA DE SANGRE

MATERIAL

- Gorro Quirúrgico
- Bata quirúrgica
- Guantes de látex
- Cubreboca
- Jeringa estéril desechable de 3 o 5 ml
- Pipetas desechables estériles de 1 a 3ml
- Papel FTA para muestra de sangre
- Termo
- Sobres de papel
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previo y/o durante la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud

4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubrebocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Durante la necropsia, posterior a la apertura craneal se tomará la sangre de la cavidad craneal con la pipeta desechable estéril en una cantidad de 5 a 10ml.
2. En caso de no ser posible, con una jeringa estéril extraer sangre directamente de corazón, en una cantidad de 5 a 10ml.
3. Etiquetar un tubo desechable con tapa de rosca de 15ml
4. Colocar la sangre en el tubo de plástico desechable y tapar adecuadamente

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. La muestra se traslada en el tubo de plástico estéril, con tapa de rosca de 15ml de capacidad, a temperatura de refrigeración de 6 a 4 °C en termo o sobre hielo o geles congelados.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. La sangre se extrae del tubo de plástico con una jeringa estéril y se deposita en el papel FTA sobre el lugar que este indica, embeber por lo menos 1cm de circunferencia del papel .
2. La muestra se deja secar a temperatura ambiente, en una zona estéril.
3. Se coloca dentro de un sobre de papel
4. Se etiqueta
5. Se conserva en un ambiente fresco y seco, sin exponerse al sol.

MUESTRA DE TEJIDO MUSCULAR

MATERIAL

- Gorro quirúrgico
- Bata quirúrgica
- Guantes de látex
- Cubrebocas
- Campos estériles
- Bisturí número 1
- Bisturí número 2
- Pinzas de disección
- Recipiente de plástico de boca ancha
- Termo
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada la muestra.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previo a la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.
4. El encargado verificará que cuente con el material a utilizar.
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Se selecciona la zona de tejido muscular esquelético mejor conservada.
2. Se lava con agua y jabón la zona seleccionada.
3. Se colocan campos estériles alrededor de la zona para no contaminarla
4. Se secciona con el bisturí número 1 estéril una zona de piel 4cm de lado, se disecciona el tejido subcutáneo hasta llegar a musculo, el cual se toma con la pinza y se extrae con el bisturí número 2 un fragmento del musculo de aproximadamente 2cm por lado o de 10 a 15 g de peso, aproximadamente.
5. Con la pinza de disección se toma el fragmento de musculo y se introduce en un recipiente de plástico estéril y de boca ancha con tapón de rosca, sin líquido fijador.
6. Se etiqueta la muestra

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Se traslada en el recipiente de boca ancha y tapa de rosca, sin líquido fijador, dentro de un termo a temperatura de 6 a 4°C o sobre hielo o geles congelados.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Se mantendrá en refrigeración a una temperatura de 6 a 4°C hasta su procesamiento.

MUESTRA DE VISCERAS

MATERIAL

- Gorro Quirúrgico
- Bata Quirúrgica
- Guantes
- Cubre bocas
- Bisturí
- Pinzas de disección
- Recipiente de plástico de boca ancha
- Etiquetas
- Termo

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro durante la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud
4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Durante la necropsia cuando ya se ha abierto cavidad torácica y abdominal se elegirá la víscera que este mejor conservada, tomando en cuenta que el corazón y el útero son las vísceras que más resiste el proceso de autólisis.
2. Una vez seleccionada la víscera in situ de la cual se tomará la muestra, con el bisturí se seccionara un fragmento de 2cm por lado o de 10 a 15g de peso
3. El fragmento de visera seccionado, se tomará con la pinza de disección para introducirla en un recipiente de plástico estéril con boca ancha y tapón de rosca, sin líquido fijador.
4. Se etiqueta la muestra

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Se traslada en el recipiente de boca ancha y tapa de rosca, sin líquido fijador, dentro de un termo a temperatura de 6 a 4°C.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Se mantendrá en refrigeración a una temperatura de 4 a 6°C hasta su procesamiento.

MUESTRA DE PELOS

MATERIAL

- Gorro Quirúrgico
- Bata Quirúrgica
- Cubre boca
- Guantes de Látex
- Pinzas de Mosco pequeñas
- Gasas estériles
- Solución Fisiológica
- Bolsas o sobres de papel
- Bolsa de plástico con cierre hermético (ziploc)
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previo a la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud
4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Seleccionar un área de la cabeza para tomar la muestra
2. Con una gasa empapada de solución fisiológica limpiar la zona de pelos seleccionados.
3. Traccionar y extraer los pelos con una pinza de mosco o con la mano, asegurarse que tengan la porción del bulbo piloso.
4. Deberán tomarse entre 20 y 30 pelos siempre que sea posible
5. Colocar los pelos dentro de la bolsa de papel, plástico o ziploc
6. Cerrar y rotular correctamente la bolsa.

TRASLADO

1. La muestra se trasladara dentro de la bolsa en la que fue colocada.
2. No requiere un ambiente especifico para ser trasladada

CONSERVACIÓN

1. En caso de que haya sido embalada en bolsa de plástico o ziploc se podrá mantener en refrigeración a una temperatura de 6°C a 4°C, hasta ser procesada.
2. Si fue embalada en sobre o bolsa de papel puede mantenerse en un ambiente fresco y seco, sin exponerse a los rayos del sol, hasta su procesamiento.

CADAVER EN ESTADO DE PUTREFACCION

Cuando un cadáver se encuentre en cualquiera de los periodos de la putrefacción ya sea cromático, enfisematoso o licuefacción, las muestras que se pueden tomar para extraer material génico son: muestra de hueso y muestra dentaria.

MUESTRA DE HUESO

MATERIAL:

- Gorro Quirúrgico
- Cobre boca
- Bata Quirúrgica
- Guantes de látex
- Gasas estériles
- Bisturí
- Pinzas de disección
- Sierra Stryker
- Segueta
- Bolsas de plástico con cierre hermético (ziploc)
- Plumón indeleble
- Etiquetas

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro posterior a la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.

4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar.
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

PROCEDIMIENTO DE TOMA DE LA MUESTRA

1. Escoger huesos largos completos, (fémur, humero, costillas)
2. Retirar el tejido pútrido con pinzas y bisturí hasta dejar solamente hueso
3. Seccionar con sierra stryker o segueta, un fragmento de 5 a 10 cm de hueso
4. Lavar el segmento hueso con agua y jabón (de preferencia detergente en polvo).
5. Secar el segmento de hueso con gasas estériles.
6. Colocar el segmento de hueso dentro de la bolsa de plástico con cierre hermético (ziploc)
7. Rotular la muestra

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. No requiere de algún tipo específico de tratamiento para el traslado.
2. Es importante que no friccionen el hueso con la bolsa para evitar que se pudiera romper la bolsa, con las aristas del hueso.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Se mantiene en congelación dentro de bolsa de plástico cerrada herméticamente, hasta su procesamiento.

MUESTRA DENTARIA

MATERIAL:

- Gorro quirúrgico
- Bata quirúrgica
- Guantes de látex
- Cubre bocas
- Pinzas de extracción
- Pinzas de disección
- Abrebocas metálico
- Separadores bucales
- Sierra de Stryker
- Cepillo dental
- Agua clorada
- Sobres de papel
- Recipientes de plástico
- Gasas
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL ENCARGADO

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. En este caso se sugiere que la muestra sea tomada por el odontólogo forense.
3. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previamente o posterior a la realización de la necropsia.
4. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.
5. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar.
6. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas

7. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Introducir un abre bocas metálico en la cavidad oral
2. Introducir un tapón (tela o gasa) a nivel de la faringe con el fin de evitar que la lengua o la presencia de líquidos corporales inundan la cavidad.
3. Posteriormente se introducen los separadores bucales
4. Se efectúa la limpieza de las piezas dentarias con cepillo y agua con cloro posteriormente se secan con las gasas.
5. Seleccionar 4 molares sin caries y sin tratamiento odontológico, en caso de no ser posible, con 2 molares es suficiente.
6. Extraer los molares con la pinza de extracción, con raíz completa.
7. En caso de que no sea posible extraer las piezas con la pinza de extracción se realizara una ventana ósea con la sierra de stryker para poder extraer las piezas dentarias completas.
8. Colocar las piezas dentarias dentro del sobre de papel previamente etiquetado o en el recipiente de plástico.

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Se trasladan dentro del sobre o recipiente de plástico en el que fueron embalados sin tratamiento específico.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Se conserva dentro del sobre de papel en un lugar fresco y seco (a temperatura ambiente).
2. También se pueden conservar en refrigeración a una temperatura de 6°C a 4°C, dentro de un recipiente de plástico tapado y rotulado.

CADÁVER QUEMADO PARCIALMENTE

En el caso de un cadáver quemado parcialmente, no es posible tomar muestras de tejidos blandos, las muestras elegibles en este caso son: muestra de hueso y muestra dentaria.

MATERIAL:

- Gorro Quirúrgico
- Cobre boca
- Bata Quirúrgica
- Guantes de látex
- Gasas
- Bisturí
- Pinzas de disección
- Sierra de Stryker
- Segueta
- Bolsas de plástico con cierre hermético (Ziploc)
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro posterior a la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.
4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar.

5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Escoger huesos no calcinados, si es posible, huesos largos (fémur, húmero, costillas) completos.
2. En caso de que tengan tejido adherido a su superficie, retirarlo con el bisturí.
3. Una vez libre de todo el tejido blando, se debe lavar la pieza ósea con alcohol del 95%(colocarlo en un frasco de alcohol, taparlo y agitarlo varias veces) posteriormente desechar el alcohol del lavado.
4. También se puede lavar el hueso con agua y jabón (de preferencia detergente en polvo), posteriormente secarlo con gasas.
5. Si no hay huesos completos, cortar de 15 a 20 cm cerca de la epífisis con la segueta o sierra stryker.
6. Colocar dentro de bolsa de plástico con cierre hermético (ziploc) o recipiente de plástico, previamente etiquetado.

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Trasladar dentro de la bolsa de plástico o recipiente de plástico, en el caso de la bolsa de plástico evitar fricción de la muestra para evitar romperla con las aristas del hueso.
2. Se trasladara a una temperatura ambiente.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Se mantendrá en congelación, en un recipiente de plástico cerrado herméticamente y etiquetado hasta el momento de su procesamiento.

CADAVER QUEMADO TOTALMENTE

En el caso de que el cadáver se encuentre totalmente quemado y no sea posible la muestra de hueso por la calcinación, el tejido que mas resiste es el diente, por lo que la única muestra que es posible tomar en este caso es dentaria.

MATERIAL:

- Gorro quirúrgico
- Bata Quirúrgica
- Guantes de látex
- Cubre boca
- Pinzas de extracción
- Sierra de Stryker
- Segueta
- Pinzas de disección
- Cepillo dental
- Agua clorada
- Gasas
- Sobres de papel
- Recipientes de plástico
- Gasas
- Etiquetas

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.

2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previamente y/o posterior a la realización de la necropsia.
3. Se sugiere la muestra sea tomada por el odontólogo forense.
4. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.
5. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar.
6. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
7. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Dependiendo del estado de conservación de los tejidos blandos peribucales se utilizara cualquiera de las tres técnicas quirúrgicas de la autopsia odontológica (técnica de Luntz, intraoral o inframandibular) hasta tener acceso a una pieza dentaria.
2. Seleccionar 2 molares con raíz completa, sin caries y sin tratamiento odontológico.
3. La pieza seleccionada se tracciona y se extrae con pinza.
4. Se realiza limpieza de la pieza con el cepillo dental y agua clorada al 10% para eliminar residuos como el carbón o partículas extrañas.
5. Posteriormente se seca con gasas.
6. Etiquetar y embalar en sobres de papel o recipientes de plástico.

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Se trasladara dentro del sobre de papel o recipiente de plástico a temperatura ambiente, sin tratamiento específico.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Se conserva dentro del sobre de papel o recipiente de plástico, etiquetados a temperatura ambiente, en un lugar fresco y seco.

CADÁVER RELACIONADO CON DELITOS SEXUALES

En el caso de que el cadáver sea del sexo femenino y se sospeche que fue agredida sexualmente es pertinente realizar muestra de exudado vaginal y anal en busca de espermatozoides.

Si el cadáver es de sexo masculino y se sospecha que fue agredido sexualmente se tomara muestra de exudado anal en busca de espermatozoides.

MUESTRA DE EXUDADO VAGINAL

MATERIAL

- Gorro quirúrgico
- Bata Quirúrgica
- Guantes de látex
- Cubre boca
- Hisopos estériles
- Solución salina o buffer de fosfato
- Tubos de plástico estériles, con tapa de rosca, de 15 ml de capacidad
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previamente a la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.

4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar.
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubre bocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Impregnar con solución salina estéril o buffer de fosfato 3 aplicadores.
2. Frotar el introito vaginal con el aplicador (hisopos)
3. Frotar con otro hisopo las paredes vaginales
4. Frotar con otro hisopo el fondo de saco
5. Colocar cada hisopo dentro del frasco estéril y sellarlo con tapa.
6. Etiquetar cada frasco estéril, indicando el sitio de donde fue tomada la muestra.

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Colocar la muestra dentro de termo o contenedor con geles congelados, para asegurar que la muestra se mantenga a baja temperatura 6°C a 4°C.

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Colocar los frascos estériles con la muestra dentro de refrigerador a una temperatura de 6 °C a 4°C hasta su procesamiento.

MUESTRA DE EXUDADO ANAL

MATERIAL

- Gorro Quirúrgico
- Bata Quirúrgica
- Guantes de látex
- Cubrebocas
- Hisopos estériles
- Solución salina o buffer de fosfato
- Tubos de plástico con tapa de rosca de capacidad de 15ml
- Etiquetas
- Plumón indeleble

PREPARACIÓN DEL TOMADOR DE LA MUESTRA

1. El encargado de tomar la muestra deberá, contar con la solicitud de la autoridad competente, especificando de que cadáver se debe tomar y para que será utilizada.
2. La muestra del cadáver deberá ser tomada en el anfiteatro previamente a la realización de la necropsia.
3. Se verificará que el número de averiguación previa, nombre y sexo del cadáver correspondan al que se encuentra en la solicitud.
4. El encargado revisará que cuente con el material a utilizar.
5. Se colocará el gorro quirúrgico , bata quirúrgica y cubrebocas
6. Se realizara lavado de manos y posteriormente se calzara los guantes de látex.

TOMA DE LA MUESTRA

1. Impregnar con solución salina, estéril o buffer de fosfato 3 hisopos.
2. Frotar la región anal con dos hisopos.
3. Frotar región perianal con otro hisopo.
4. introducir los hisopos en cada frasco, indicando la zona o región de donde fue tomada la muestra.
5. Etiquetar cada frasco estéril,

TRASLADO DE LA MUESTRA

1. Colocar la muestra dentro de termo o contenedor con geles congelados, para asegurar que la muestra se mantenga a baja temperatura 6°C a 4°C

CONSERVACION DE LA MUESTRA

1. Colocar los frascos estériles con la muestra dentro de refrigerador hasta el momento del procesamiento.

ROTULADO DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras deben estar rotuladas en forma clara

Las muestras que no estén rotuladas como se indica, no deberán ser aceptadas por la unidad receptora.

Deben rotularse todos los envases

- Frascos
- Jeringas
- Bolsas
- Sobres
- Tubos

Se utilizara marcador indeleble

El rotulo deberá contener:

- Tipo de material biológico (sangre, músculo, hueso, pelos, exudado vaginal, exudado anal,) que contiene el envase.
- Nombre del occiso del cual fue tomada la muestra
- Numero de Averiguación Previa
- Número de Expediente del Servicio Médico Forense
- Nombre del personal a cargo de la toma de la muestra
- Fecha y hora de la toma de la muestra
- Unidad receptora a la cual se envía según sea el caso

CONCLUSION

La investigación realizada mediante la elaboración del procedimiento normalizado de operación pretenderá proporcionar una herramienta útil al área de identificación y genética forense, el cual al aplicarse correctamente evitara errores en la toma, traslado y conservación de muestras de tejidos de cadáver para la obtención de material génico, sin desperdiciar, recursos humanos, materiales, económicos y tiempo para poder obtener el resultado que motivó la toma, de forma breve, cumplirá con las características necesarias para la posterior extracción de ADN.

Es por eso que la utilización de un procedimiento normalizado de operación permitirá no solo implementar una estandarización en los procesos de toma, conservación y traslado de muestras de tejido de cadáver para la obtención de ADN, además será útil en la inducción y capacitación del personal a cargo, asegurara la continuidad del proceso, el mejor control de calidad, y mantendrá la cadena de custodia.

Es importante señalar que un procedimiento normalizado de operación debe ser autorizado por el personal a cargo de los servicios en los cuales será aplicado, y el personal administrativo que rige la Institución, en este caso el Servicio Médico Forense del Distrito Federal, y revisado periódicamente para hacer las adecuaciones pertinentes en su momento.

Es por eso que este trabajo pretende sentar las bases para la elaboración y autorización de un procedimiento Normalizado de Operación, que en la actualidad no existe en el Servicio Médico Forense de Distrito Federal, que posteriormente se vaya adecuando a las necesidades requeridas con el paso del tiempo y avances tecnológicos y pueda llegar a estandarizarse en los Servicios Médicos Forenses de los diferentes estados de la República Mexicana que no cuentan actualmente con él.

DISCUSIÓN

En esta propuesta de procedimiento normalizado de operación en la toma, conservación y traslado de muestras de tejido de cadáver para la obtención de material génico, es de observancia que por más apegado al procedimiento normalizado de operación que se realice la toma, existen posibilidades de error humano por lo que será necesario ya en su aplicación ir haciendo los ajustes pertinentes, dadas las limitaciones de recursos materiales y humanos con que cuenta cada institución al aplicarlo por lo que sería conveniente hacer las modificaciones tanto a la técnica, como a la norma en virtud de las necesidades de las mismas, ya que dichos ajustes tendrán que ir evolucionando a la par con los avances técnicos y científicos que exige la aplicación de este procedimiento normalizado.

Será conveniente en el futuro una revisión así como hacer pruebas estandarizadas para que el procedimiento siga teniendo vigencia y no se pierda el objetivo primario que es la identificación de cadáveres, hoy por hoy la globalización y los sistemas modernos de comunicación han hecho de este mundo algo más pequeño, sin embargo sigue siendo una problemática cada vez más compleja la identificación de restos humanos, por los desastres masivos naturales o de tránsito así como la sofisticación de los criminales al tratar de desaparecer los restos humanos.

Con este humilde trabajo pretendo contribuir en el proceso de procuración y administración de justicia, para hacer de este país un lugar más digno para las generaciones venideras

BIBLIOGRAFIA

1. Sotelo Rosario Alicia, Lago, Eleta Graciela, Gattí Carlos. ADN y Medicina Forense. Cuadernos de Medicina Forense, Año 1, No.1, p 1-17. Junio 2002
2. Jeffreys A.J. Wilson V. Thein SL. Individual- specific "fingerprints" of human DNA. Nature 1985:314: 67-73
3. Lorente Antonio José. Un detective llamado ADN . Temas de hoy 2004.
4. Gill P. Werret DJ. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. Forensic Sci Int 1987: 35: 145-148
5. Lewotin RC. Hartl DL. Population studies in forensic DNA typing. Science 1991: 2554:1745-1751
6. Chakraborty R. Kidd KK. The utility of DNA typing in forensic work. Science 1991: 254: 1735-1739.
7. Martínez Jarreta Ma. Begoña. La prueba de AND en Medicina Forense. Masson.S.A . 1999
8. Hopgood R. Sullivan K. Gill.P. Strategies for automated of human mitochondrial DNA directly from PCR products Biotechniques 1992:13:82-92
9. Calabuig Gisbert. Medicina Legal y Toxicología (Sexta edición). Ed. Masson S.A. Barcelona. 2003.
10. Akane A.; Shiono H. et al. 1993. Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis. J. Forensic Sci. 38: 691-701.

11. Jiménez-Arce Gerardo, Morera-Brenes Bernal. Revisión sobre la extracción de ADN partir de huesos humanos Med. leg. Costa Rica v.16 n.1-2 Heredia set. 1999
12. Martínez F. & Gamba G. (1996). Biología molecular en medicina. IV. Implicaciones médicas de la secuenciación del DNA. Rev Invest Clin, 48, 401-6.
13. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M. et Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene*, Fifth edition, San Francisco: Benjamin Cummings.
14. Mathews, C. K.; Van Holde, K.E et Ahern, K.G (2003). «6», *Bioquímica*, 3, 204 y ss.
15. Bartlett & Stirling (2003)—A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol*. 226:3-6
16. LORENTE ACOSTA, J. A., y LORENTE ACOSTA, M.: El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica, Comares, Granada, 1995
17. DNA recommendations. 1992 report concerning recommendations of the DNA Commission of the ISFH relating to the use of PCR-based polymorphisms. (1992). *International Journal of Legal Medicine* 110: 175-176.
18. PRICAI. Fundación Favaloro. Instructivo para toma y conservación de muestras para estudio del polimorfismo del ADN.

19. Werner Schuller, Lyn Fereday y Richard Scheithauer MANUAL DE INTERPOL SOBRE EL INTERCAMBIO Y LA UTILIZACION DE DATOS RELATIVOS AL ADN Recomendaciones del Grupo de Expertos en ADN de Interpol Primera edición Lyon, junio de 2001.
20. Autor Externo Criminalistica.com.mx . Criminalistic.org [v3.0] - La página de Criminalística de México, marzo de 2007
21. Rocabado O., Núñez de Arco J., Rocabado G.), Lorente J. Normalización de la toma de muestras para la investigación de la paternidad biológica a través del análisis de ADN Revista Médica, 2004. Vol. 10 N° 3: 20-26
22. Miguel Lorente Acosta, José Antonio Lorente Acosta y Enrique Villanueva Cañadas La medicina clínica ante los indicios criminales biológicos y la identificación genética Med Clin (Barc) 1994; 102: 113-115.
23. Marian Martinez de Pancorbo. Extracción y Caracterización del DNA del hueso esponjoso reciente y de los siglos XVI y XVII. Munibe Antropología y Arkeologia.Supl.8, 209 – 212.San Sebastian 1992.
24. L. Prieto, A. León, E. García, E. Prat, A. Rodríguez-Monge, E. Rivas Comparación de distintos métodos de extracción de ADN en restos óseos para análisis de STRS vía PCR. Comisaría General de Policía Científica Madrid. España.
25. Lourdes Prieto Solla Aplicaciones forenses del ADN. Comisaría General de Policía Científica. Laboratorio de ADN