

Explorando la Ciencia Forense: Experiencia de Pasantía en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses

Estudiante
Karen Mayerly Español Contreras

Directora
Ana Lucía Páez Vila

Codirectora
Juliana María Martínez Garro

Trabajo de Grado
En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología
Universidad CES
Medellín
29 de mayo 2024

Explorando la Ciencia Forense: Experiencia de Pasantía en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses

Karen Mayerly Español Contreras

Resumen

En este informe, se describen las actividades generales de una pasante en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLyCF) y se ofrece una visión general de los servicios que ofrece la institución; posteriormente, se describen los objetivos principales que se propuso al inicio de la pasantía. A lo largo del informe, se detallará las distintas áreas en las que se trabajó. Además, se comparten los logros alcanzados durante este período. Se presentan conclusiones sobre esta experiencia en el desarrollo profesional y se ofrecen recomendaciones para futuros pasantes que estén interesados en realizar su pasantía en este instituto. Por último, se comparte el trabajo de investigación realizado, ofreciendo un resumen de los temas abordados, las metodologías utilizadas y las conclusiones alcanzadas.

Palabras clave: Pasantía, Servicios, INMLyCF.

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	4
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4. LOGROS ALCANZADOS	6
5. DIFICULTADES.....	6
6. RESULTADOS	6
6.1 CAPACITACIÓN DE BIOSEGURIDAD.....	6
6.2 EXPERIENCIA DE UN BIÓLOGO EN EL CAMPO FORENSE.....	6
6.3 PRESENTACIÓN EN CLUB DE REVISTA.....	11
7. CONCLUSIONES	11
8. RECOMENDACIONES.....	12
9. BIBLIOGRAFÍA	12
10. ANEXOS.....	12

1. Presentación

El Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses representa un entorno donde se puede aplicar la teoría aprendida en el aula a situaciones reales. Esta experiencia práctica proporciona una comprensión más profunda de los principios biológicos presentes en la investigación criminalística.

La pasantía en este instituto ofrece una visión completa de los procesos moleculares, lo cual es de gran valor para estudiantes de biología interesadas en entender cómo este campo impacta en el sistema de justicia. Desde participar en la recepción de casos hasta la entrega de informes periciales, esta experiencia brinda una perspectiva única sobre el rol de los profesionales de la biología en la administración de justicia. También, posibilita aportar al progreso social al facilitar la identificación de individuos que permanecían desaparecidos durante largos períodos. Esta labor de reconocimiento ofrece consuelo a las familias que han sufrido debido a la persistente violencia que ha marcado la historia del país.

2. Reseña de la institución

El Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forense es un establecimiento público de referencia técnico-científica que dirige y controla el sistema de Medicina Legal y Ciencias Forenses en Colombia. Prestan servicios forenses a la comunidad y a la administración de justicia sustentados en la investigación científica y la idoneidad del talento humano en un marco de calidad, imparcialidad, competitividad y respeto por la dignidad humana (1). Las ciencias forenses, son un conjunto de disciplinas de las ciencias naturales, que aplican el método científico al análisis de los elementos materia de prueba "EMP" o evidencias físicas "EF" con el fin de proporcionarle a la administración de justicia evidencia científica imparcial sobre las circunstancias de tiempo, modo y lugar en el que ocurrieron los hechos motivo de investigación. Su campo de trabajo está relacionado con el reconocimiento, identificación, individualización y evaluación de los elementos materiales probatorios y en algunos casos, con su testimonio como testigo pericial ante la corte (2).

Dentro de estos servicios se encuentra el laboratorio de Biología Forense que se ocupa del análisis de muestras biológicas recolectadas como EMP de posibles hechos delictivos para determinación de sangre humana, búsqueda e identificación de espermatozoides, análisis macroscópico y microscópico de elementos pilosos y determinación de saliva humana. Los resultados reportados permiten orientar a la autoridad competente, acerca de la utilidad de solicitar estudio genético con el fin de identificar al individuo del cual procede el material biológico analizado. También cuenta con el laboratorio de Genética Forense donde se estudia la herencia que sirve como apoyo a investigaciones judiciales para la identificación de personas, cadáveres y fragmentos corporales humanos, individualización de vestigios

biológicos de interés en la investigación criminal y en la investigación genética de la filiación o pruebas de paternidad y/o maternidad (2).



Figura 1. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencia forenses.

Tomada de: <https://www.medicinalegal.gov.co/>

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Adquirir conocimientos, habilidades y destrezas de las ciencias biológicas aplicadas al campo forense.

3.2 Objetivos específicos

1. Obtener habilidades prácticas y técnicas específicas para llevar a cabo la detección de fluidos corporales y análisis genéticos relevantes en el contexto forense.
2. Identificar y comprender los tipos de análisis realizados en los laboratorios de biología y genética forense, incluyendo la detección de fluidos corporales y los análisis genéticos aplicados.
3. Aplicar técnicas estadísticas en la interpretación de resultados genéticos con el fin de determinar el origen de muestras biológicas, como parte del proceso analítico forense.
4. Realizar una revisión exhaustiva sobre las diversas metodologías y análisis empleados en la investigación del ADN mitocondrial en el ámbito forense para ampliar el conocimiento sobre esta área específica y su aplicación práctica en la resolución de casos.

4. Logros alcanzados

- Capacitación en Bioseguridad donde se adquirieron conocimientos sobre normas de calidad y seguridad en laboratorios.
- Experiencia en el campo forense donde se desarrollaron habilidades y responsabilidades de un biólogo en el ámbito forense.
- Rotación por diferentes áreas del Instituto: Administración de Casos, Metrología, Biología, Restos Óseos y Genética.
- Presentación en club de revista sobre tipos de extracción y análisis de ADN mitocondrial.
- Elaboración y envío de un artículo de revisión a una revista científica.

5. Dificultades

La pasantía tuvo que extenderse debido a los inconvenientes que surgieron al inicio por los documentos solicitados en el Instituto; esta situación imprevista hizo imposible que se comenzara en la fecha programada. Este retraso inicial generó la necesidad de comenzar después de la fecha programada para poder cumplir con los objetivos y responsabilidades establecidos. Es importante destacar que la decisión de alargar la pasantía se tomó en consulta con las coordinadoras responsables de la pasantía.

6. Resultados

6.1 Capacitación de bioseguridad

Antes de comenzar las prácticas se asistió a la capacitación en buenas prácticas de laboratorio y bioseguridad con una intensidad de 2 horas teóricas, con el fin de que la estudiante tuviera conocimiento de las normas y los estándares de calidad y seguridad establecidos por los laboratorios, además de conocer los riesgos asociados a los productos químicos, desechos y procedimientos utilizados para prevenir accidentes, lesiones y contaminaciones cruzadas.

6.2 Experiencia de un Biólogo en el campo forense

Es crucial destacar que la efectividad de las investigaciones penales está estrechamente ligada a las pruebas técnicas proporcionadas por peritos y especialistas involucrados en cada caso. Por tanto, las instituciones de justicia que tienen la capacidad de generar pruebas técnico-científicas son fundamentales para asegurar el adecuado desarrollo del programa metodológico de investigación criminal en nuestro país (3). Por lo tanto, es de suma

importancia que estos establecimientos cuenten con personal altamente capacitado en estas áreas del conocimiento para evitar errores en los dictámenes. Es por esto por lo que realizar una pasantía en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses resulta fundamental para el estudiante, ya que le brinda la oportunidad de comprender cómo se desenvuelve un biólogo en este ámbito, asumiendo responsabilidades y obligaciones, así como adquirir las habilidades necesarias para desempeñarse como profesional en un entorno laboral, lo que fortalece su desarrollo profesional. La pasantía también ofrece a la estudiante la oportunidad de desarrollar destrezas prácticas en el laboratorio, así como de adquirir una mayor competencia en la aplicación de técnicas y metodologías específicas. Permitiendo comprender más profundamente los procesos y conceptos asociados con estas técnicas, lo que enriquece su formación académica y su capacidad para contribuir de manera efectiva en el campo forense.

Áreas de la pasantía

En el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, se establece que cada estudiante debe rotar por cuatro áreas fundamentales cada mes. Esto se hace para que la estudiante comprenda el proceso desde cómo deben llegar las muestras y el debido manejo de los Elementos Materiales de Prueba (EMPs) en el sistema judicial, así como comprender todo el proceso de análisis.

1. Administración de casos

Se comenzó la pasantía por el área de administración de casos, la estudiante comprende cómo llegan las muestras de cada caso, cada una debe estar sellada y rotulada con su cadena de custodia sin manchas ni tachones para que pueda ser remitida. Luego se procede a la recepción de los EMPs donde se sube al sistema generando un número de radicado único para cada caso. Posterior a esto, se estudia el caso y se ordena de acuerdo con su nivel de prioridad para ser asignado a un perito y ser analizado.

En esta área también se realiza capacitaciones de toma de muestras a diferentes ramas como criminalística y medicina, ya que son las primeras personas encargadas de garantizar el correcto embalaje, rotulado y toma de las muestras para proceder a realizar su respectivo análisis dentro del laboratorio. En algunos casos de construcción de genealogías el perito a cargo de esta área debe estar presente a la hora de la toma de muestras sanguíneas en tarjetas FTA para dar claridad sobre los procesos y formatos necesarios para el procesamiento de las muestras. Se estima en promedio veinte casos recibidos y aceptados para su análisis.

2. Metrología

La segunda área donde la estudiante rota es en el área de metrología, la ciencia de las mediciones. Aquí se reconoce la importancia de seguir con las normas del laboratorio

teniendo un inventario, plan de mantenimiento, verificación y calibración de cada equipo del laboratorio. En esta área se resalta la importancia de tener los equipos calibrados como las balanzas y las pipetas que los peritos utilizan para realizar cada proceso, ya que son instrumentos críticos para medir cantidades precisas de reactivos que se utilizan en cada proceso. La calibración disminuye el margen de error dando mediciones más exactas y confiables para el perito, brindando más fiabilidad en los resultados obtenidos. También se tiene en cuenta la temperatura y la humedad relativa ya que estos factores ambientales pueden afectar la precisión de los datos en estos equipos.

Cada día se toman datos de temperatura de neveras y de hornos para verificar que estén funcionando adecuadamente ayudando a su preservación y garantizando su estabilidad e integridad de las muestras y los reactivos utilizados en cada análisis. Además, las bajas temperaturas proporcionan un ambiente estable y controlado para que las muestras de ADN no se desnaturalicen y se preserven con el tiempo.

3. Área de Biología

En el área de biología, el estudiante aprende a identificar los cuatro tipos de muestras presentes: semen, saliva, sangre y pelos. Cada tipo de muestra requiere diferentes pruebas preliminares y en algunas confirmatorias, y estos procesos están descritos paso a paso en los documentos técnicos conocidos como Protocolos Estandarizados de Trabajo (PET). El análisis varía según la muestra obtenida. Para la muestra de semen, se utilizan técnicas como el árbol de navidad e inmunocromatográfica para identificar proteínas como el antígeno específico de próstata (PSA) o semelogenina presentes en este fluido. El estudiante desarrolla habilidades para identificar visualmente la morfología y colorimetría de los espermatozoides en diferentes muestras con células epiteliales (figura 2), además de realizar de manera ágil la lectura de láminas. Se hizo lectura aproximadamente de diez láminas con tinción.

En el caso de la muestra de saliva, se realiza una prueba inmunocromatográfica para detectar la presencia de la proteína alfa-amilasa. Se estuvo presente aproximadamente en once casos. De manera similar, para la muestra de sangre, se utiliza la técnica inmunocromatográfica para reconocer la presencia de hemoglobina (figura 3). Durante estos procesos, se comprende la toma de muestras y el proceso de extracción, para luego realizar la lectura y análisis de los resultados. Además, se reconoce la importancia de incluir siempre controles de calidad y gestionar correctamente la cadena de custodia para asegurar la veracidad y transparencia de los resultados.

En cuanto a la identificación de pelos, se emplean técnicas diferentes que involucran factores macro y microscópicos. Estos factores incluyen la forma del bulbo, la forma interna y otros aspectos que permiten distinguir entre pelos de animales y pelos humanos. En la estadía en esta área no hubo casos de identificación de pelos humanos, pero se tuvo la oportunidad de comparar pelos de diferentes tipos de especies con las de humano y así

poder identificar de forma más clara las diferencias morfológicas que se encuentran en estas muestras.

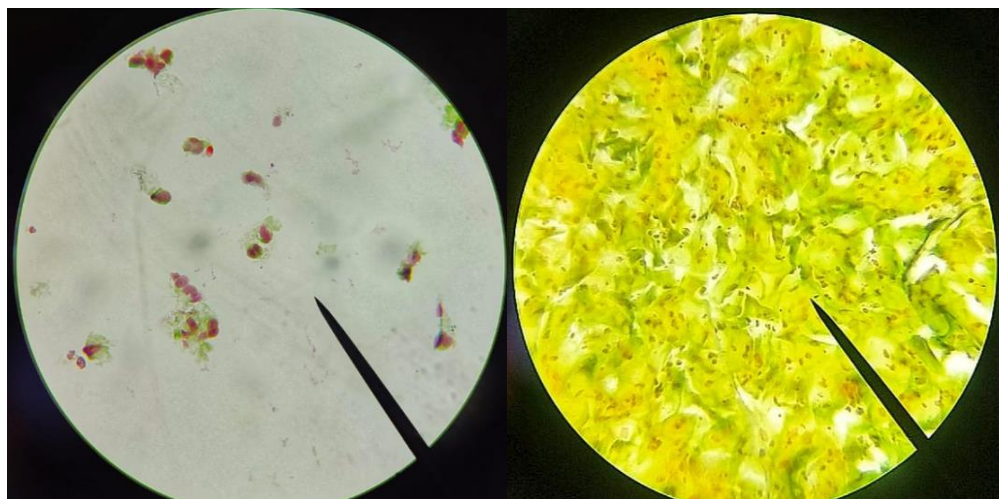


Figura 2. Tinción Árbol de Navidad.

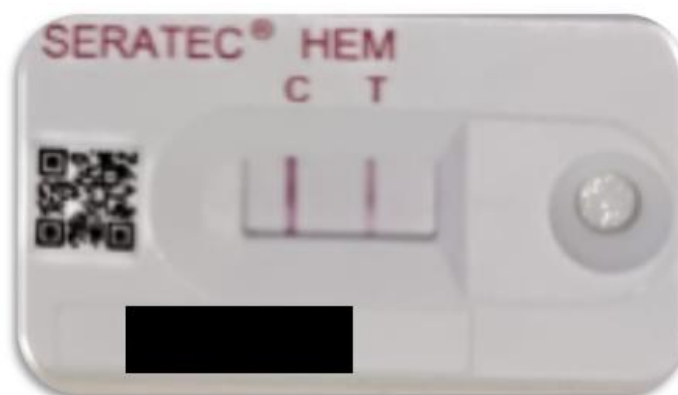


Figura 3. Test de pruebas inmunocromatográficas.

4. Restos óseos

La estudiante comprende cómo se realiza el procesamiento de casos de restos óseos para identificación humana. Cuando llegan las muestras de huesos, se debe seleccionar la mejor pieza para analizar. En el instituto, se recomienda dar prioridad a huesos largos y piezas dentales, ya que estudios indican que son las partes donde el ADN se conserva mejor. Una vez seleccionada la pieza es triturada en partes pequeñas, se realiza un proceso de limpieza mediante lavados con hipoclorito y agua desionizada. Esto facilita el desprendimiento de

tejido y garantiza una superficie limpia para el análisis. Luego, los huesos se secan y se pulverizan utilizando esferas de acero inoxidable.

Una vez pulverizado, se realiza un proceso de digestión y descalcificación utilizando proteinasa K y agentes quelantes para separar el ADN de la matriz mineral en la que se encuentra. Durante este proceso, el ADN se mantiene protegido de la degradación causada por los cristales de hidroxapatita y es liberado al medio junto con los productos proteicos de la digestión. Posteriormente, el ADN se aísla de los restos celulares utilizando técnicas de extracción y purificación, como fenol-cloroformo, columnas de sílice o perlas de magnesio (Prepfiler). Es importante destacar la necesidad de contar siempre con controles para verificar la ausencia de contaminación en cada etapa del proceso.

Una vez obtenido el ADN, se realiza una PCR cuantitativa (PCRq) para determinar el grado de degradación de las muestras, ya que muchas veces llegan en mal estado. Conociendo la cantidad de ADN y el grado de degradación de cada muestra, el perito realiza cálculos estadísticos para ajustar la concentración de ADN necesaria en la PCR, de manera que pueda amplificarse y ser posteriormente leído por electroforesis capilar. Esto permite obtener un perfil genético y realizar interpretación de resultados para poder cotejar con muestras ya existentes o ser ingresadas a CODIS. Es importante señalar que en este campo se procesaron más de veinte casos, ya que no está sujeto a un límite mensual de casos como lo están las otras áreas.

5. Área de Genética

En el área de criminalística, la estudiante acompaña la recepción y clasificación de los casos recibidos como homicidios, lesiones personales y delitos sexuales. Esta área se centra en la realización de pruebas genéticas, donde se destacan los cálculos bioestadísticos para evaluar diferentes aspectos como *stutters* y alelos nuevos en la población, así como el análisis de mezclas.

Para llevar a cabo estas pruebas, se debe primero extraer y purificar el ADN de muestras biológicas diversas, tales como sangre, células epiteliales y pelo. Una técnica crucial es la extracción diferencial de muestras postcoitales, la cual permite separar espermatozoides de células epiteliales utilizando equipos semiautomáticos con esferas magnéticas (prepfiler).

Una vez obtenido el ADN, se procede a realizar una PCR para obtener un electroferograma que revela los resultados de la extracción (figura 4). Antes de analizar estos resultados, es crucial realizar un punto de control donde se compara el perfil obtenido con los perfiles de todos los integrantes del equipo forense, asegurando así que no haya habido contaminación cruzada durante el proceso. Además, se verifica la validez de los controles negativo y positivo para confirmar que los reactivos se encuentren libres de contaminación y no se presentara errores durante el montaje de la PCR.

Finalmente, se obtiene un electroferograma completo donde se pueden observar los alelos de cada marcador presente en el kit utilizado, lo que permite realizar análisis estadísticos posteriores para determinar la relevancia de la información genética en el caso en cuestión.

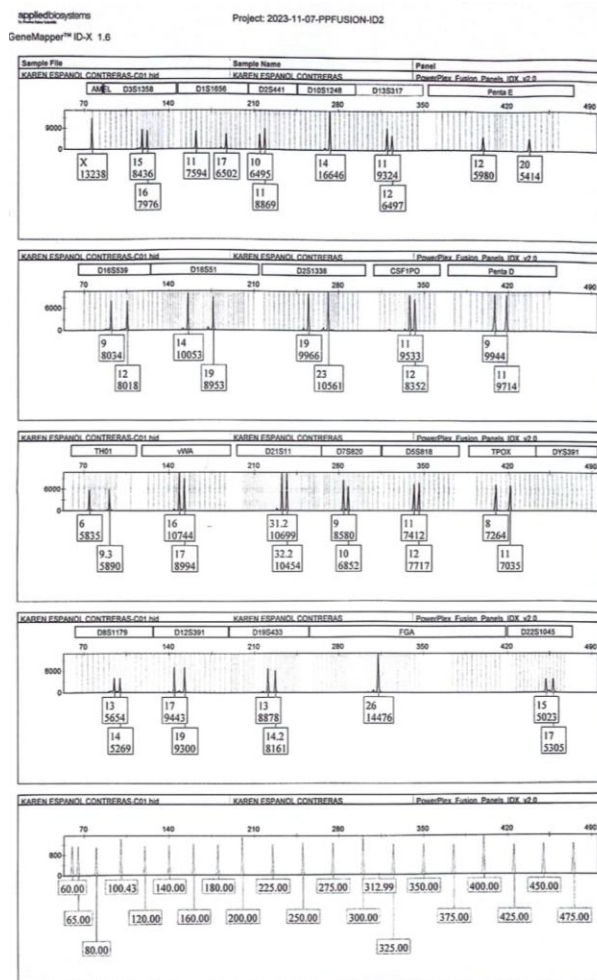


Figura 4. Perfil genético extraído de tarjeta FTA del estudiante.

6.3 Presentación en club de revista

Se llevó a cabo una exhaustiva revisión de la bibliografía existente para recopilar información científica sobre las diversas estrategias y metodologías de análisis forense del ADN mitocondrial. Una vez completada esta etapa, se procedió a organizar y sintetizar la información para su presentación de manera clara y precisa en el club de revista del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses al finalizar la pasantía. Finalmente, se procede a preparar el artículo de revisión para su publicación (ver anexo).

7. Conclusiones

Realizar una pasantía en el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses es una oportunidad invaluable para los estudiantes, ya que les permite comprender de primera

mano el funcionamiento de un biólogo forense, así como adquirir habilidades prácticas y teóricas relevantes para su desempeño profesional. Además, esta experiencia les permite fortalecer su contribución al campo forense en el futuro. No solo se trata de la experiencia adquirida, sino también de la posibilidad de formar parte activa y aportar al sistema de justicia del país.

8. Recomendaciones

Recomiendo a los estudiantes tener siempre una actitud proactiva y abierta al aprendizaje durante la pasantía, mostrando disposición para aprender y buscando oportunidades para adquirir nuevas habilidades y conocimientos. Además, es crucial ser puntual y comprometido en un entorno de laboratorio, demostrando disposición e interés para cumplir con los reglamentos establecidos en la institución. Antes de comenzar, es importante conocer y entender todas las normas de seguridad del laboratorio, ya que la seguridad es una prioridad y los estudiantes deben estar conscientes de los procedimientos y protocolos para evitar cualquier inconveniente en el laboratorio. Además de tener buenas bases teóricas en biología forense, genética, química y estadística para poder comprender de una forma más clara y rápida los procesos realizados.

9. Bibliografía

1. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses [Internet]. Available in: <https://www.medicinalegal.gov.co/quienes-somos>.
2. Portafolio de Servicios Forenses - Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses [Internet]. Available in: <https://www.medicinalegal.gov.co/portafolio-de-servicios>.
3. Modelo de protocolo latinoamericano de investigación de las muertes violentas de mujeres por razones de género (femicidio/feminicidio) [Internet]. ONU Mujeres. Available in: <https://www.unwomen.org/es/digital-library/publications/2014/8/modelo-de-protocolo-latinoamericano>.

10. Anexos

Artículo de revisión presentado en el club de revista del INMLCF. La revista donde se enviará para que sea publicado se conoce como: Revista Actualidades Biológicas de la Universidad de Antioquia.

**Revisión de las diferentes estrategias y metodologías de análisis forense de ADN
mitocondrial**

**Review of different strategies and methodologies for forensic analysis of
mitochondrial DNA**

Karen Español-Contreras*¹, Erika Salguero², Ana Paez-Vila², Juliana Martínez-Garro³

¹Estudiante de Biología, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES

²Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias forenses, Medellín, Colombia.

³Grupo Biología CES, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES.

RESUMEN

El análisis de ADN mitocondrial se ha convertido en una herramienta en el campo forense cuando el ADN nuclear está degradado o ausente. Esta técnica se vuelve especialmente relevante en casos donde no hay otras soluciones viables disponibles, proporcionando una alternativa para las autoridades judiciales al enfrentarse a escasez de información. Como resultado, ha habido un aumento significativo en las solicitudes de análisis en este campo. Esta revisión examina diversos métodos utilizados en la extracción, amplificación, secuenciación y análisis del ADN mitocondrial, destacando su importancia y comparando su eficacia; además de proporcionar una visión de opciones disponibles para el ADN mitocondrial.

Palabras claves: ADN mitocondrial, Forense, Métodos.

¹**Autor de correspondencia:** Karen Mayerly Español Contreras. Universidad CES.
CII 10A N 22 - 04, Poblado. Teléfono: 322 6481907. Medellín, Antioquia, Colombia.
correo electrónico: espanol.karen@uces.edu.co

ABSTRACT

Mitochondrial DNA analysis has become a tool in forensic science when nuclear DNA is degraded or absent. This technique becomes particularly relevant in cases where no other viable solutions are available, providing an alternative for judicial authorities facing a scarcity of information. As a result, there has been a significant increase in requests for analysis in this field. This review examines various methods used in the extraction, amplification, sequencing, and analysis of mitochondrial DNA, highlighting its importance and comparing its effectiveness, as well as providing an overview of available options for mitochondrial DNA.

Keywords: Mitochondrial DNA, Forensic, Methods.

INTRODUCCION

En 1981, se logró un hito crucial en genética al secuenciar por completo el genoma mitocondrial, compuesto por 37 genes y 16,569 pares de bases (Coronel Guzmán, 2023). El ADN mitocondrial (ADNmt) se distingue por su falta de recombinación, su alto número de copias, su herencia exclusivamente materna (J. Quintero Ferrer et al., 2018) y su alta tasa mutacional (Torres, 2009). Esto implica que todos los miembros de una familia comparten el mismo ADNmt a lo largo de las generaciones (Syndercombe Court, 2021), lo que podría facilitar la resolución de vínculos biológicos complejos (Ovchinnikov et al., 2016). La mitocondria se divide en dos regiones principales: una región codificante y una región control. La región control, que consta de 1.121 pares de bases, es especialmente significativa en los laboratorios de genética debido a su alta variabilidad interpersonal. Esta región se divide en tres áreas conocidas como regiones hipervariables (HV), incluyendo HV1, HV2 y

HV3. La variabilidad genética encontrada en HV1 y HV2 supera a la de HV3, lo que las convierte en las regiones más secuenciadas para estudios forenses (Ferrer et al., 2019). Por lo tanto, las regiones hipervariables se consideran la parte más informativa del genoma mitocondrial (Anderson et al., 1981). La secuenciación del ADNmt se ha utilizado ampliamente en laboratorios forenses en todo el mundo, especialmente en casos que involucran evidencia biológica con condiciones crítica (Avila et al., 2019).

A pesar de sus ventajas, el ADNmt presenta diversas limitaciones en su uso. Su variabilidad genética es limitada, dificultando la distinción entre individuos relacionados por el linaje materno y restringiendo su capacidad de discriminación en ciertos casos (Crespillo et al., 2011). Además, su herencia exclusiva por línea materna lo hace inadecuado para establecer vínculos familiares paternos, reduciendo su utilidad en situaciones que requieren identificar relaciones genéticas paternas y en la discriminación de persona (Parsons & Coble, 2001). La contaminación cruzada de muestras de ADNmt durante la manipulación y el procesamiento puede dar lugar a resultados incorrectos o a la interpretación errónea de los datos, dado que se puede confundir con heteroplasmia (Bandelt & Salas, 2012). Además, la interpretación de los resultados del análisis del ADNmt puede ser complicada debido a la presencia de heteroplasmia, que es la coexistencia de diferentes secuencias de ADNmt en una misma célula o individuo, lo que requiere un análisis minucioso (Brandstätter & Parson, 2003).

El ADN mitocondrial se considera más susceptible a la contaminación en comparación con el ADN nuclear debido a varias razones. En primer lugar, cada célula contiene múltiples copias de ADN mitocondrial, mientras que solo hay dos copias de ADN nuclear (Prieto Solla, 2004). Esta mayor cantidad de copias de ADN mitocondrial aumenta las posibilidades de contaminación durante el proceso de extracción y análisis. Además, el ADN mitocondrial se

encuentra dentro de las mitocondrias, estructuras celulares presentes en gran número en las células y dispersas en el citoplasma. Las mitocondrias pueden liberar su contenido de ADN mitocondrial en el entorno circundante, aumentando así la probabilidad de contaminación (Cruz Hernández, 2019).

Aunque el ADNmt presenta desventajas, sigue siendo una fuente valiosa de información genética en investigaciones forenses. Se ha demostrado que es más resistente a la degradación que el ADN nuclear debido a su alto número de copias por célula (Amorim et al., 2019), lo que lo hace especialmente útil en casos donde las muestras son antiguas o cuando el ADN nuclear está degradado o limitado y no es viable para su análisis (Ballard, 2016). También es útil cuando los familiares son pocos informativos, lo que implica la falta de parientes que compartan la misma línea materna (Gazi, 2018). El ADN mitocondrial, a pesar de su limitada capacidad para determinar la identidad individual debido a la ausencia de recombinación, es valioso al confirmar el linaje materno y proporcionar una alternativa de análisis cuando el ADN nuclear no es suficiente (Stoljarova et al., 2016). Su relevancia aumenta en situaciones donde no hay otras soluciones disponibles, siendo particularmente útil para las autoridades judiciales en casos con escasa información disponible, lo que ha impulsado un aumento en las solicitudes de análisis de ADNmt en medicina forense, especialmente en casos donde el análisis de ADN nuclear no es posible o en situaciones donde el análisis de STR podría tener eficiencia limitada (Alonso et al., 2012).

METODOLOGIA

Para la recopilación de datos se buscó literatura que abarcaba artículos científicos, que trataran el tema del ADNmt en el análisis forense y se hizo un mayor énfasis en aquellos artículos que mencionaran los métodos de extracción y análisis de ADNmt. La información

se recolecto de la literatura que se encontró disponible en diferentes bases de datos como *Pubmed*, *Google scholar*, *Nature*, *Sciencedirect* y *SpringerLink*. Se utilizaron la combinación de algunas palabras claves como ADN mitocondrial, extracción ADN, identificación, métodos de análisis, etc. Solo se tomaron artículos publicados de los últimos años, desde el año 1993 hasta el año 2023, ya que en estos años se concentran la mayoría de las publicaciones sobre este tema. Adicionalmente los criterios de exclusión fueron artículos donde no mencionaban las técnicas que utilizaban para procesar el ADNmt o artículos que estuvieran por fuera del rango analizado, finalmente se tomó la literatura publicada en idioma inglés y español.

DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Fenol cloroformo

La extracción de ADN es una técnica fundamental en la investigación científica, con aplicaciones diversas que incluyen la investigación forense. Uno de los métodos ampliamente utilizados es la extracción con fenol/cloroformo, que permite separar el ADN de otros componentes biológicos como proteínas, cofactores e iones. Por ejemplo, en muestras de cabello, este método puede proporcionar hasta 30 uL de muestra, lo que permite realizar análisis genéticos y secuenciación (Takayanagi et al., 2003)

Se ha observado que diferentes protocolos de extracción de ADN pueden ser efectivos para eliminar los inhibidores de la PCR. Un estudio comparativo en restos óseos encontró que tanto el método de extracción con fenol-cloroformo como otros métodos fueron eficientes en este sentido (Vélez et al., 2022). Aunque la extracción orgánica con fenol/cloroformo ha sido habitualmente el método principal de purificación, se han desarrollado alternativas debido a

la toxicidad de los reactivos y el tiempo requerido para el procedimiento (Valverde et al., 2011).

Sin embargo, el método de extracción con fenol/cloroformo presenta algunas desventajas importantes a considerar. En primer lugar, los reactivos utilizados en este método tienen un alto grado de toxicidad, tanto para las personas como para el medio ambiente. Esto plantea preocupaciones en términos de seguridad y manejo adecuado de los productos químicos. Además, el proceso de extracción con fenol/cloroformo puede llevar más tiempo en comparación con otros métodos disponibles. Esto puede ser un factor limitante en situaciones en las que se requiere un procesamiento rápido de las muestras (Pérez Sánchez, 2022).

Otra desventaja es la posibilidad de contaminación cruzada. Debido a los numerosos pasos involucrados en el proceso de extracción con fenol/cloroformo, existe un mayor riesgo de que se produzca contaminación entre las muestras. Además, el método de extracción con fenol/cloroformo no favorece la automatización como otros métodos disponibles. Debido a la complejidad y los múltiples pasos requeridos en el proceso, la extracción con fenol/cloroformo puede resultar más difícil de automatizar, lo que limita su eficiencia y capacidad de procesamiento en comparación con alternativas más automatizadas (Gazi, 2018)

Columnas de sílice

El método de extracción de ADN mediante columnas de sílice ha demostrado ser altamente eficiente en la recuperación de ADN. Estas columnas contienen una matriz de sílice que actúa como soporte para el ADN y facilita su retención mientras se eliminan las impurezas. Durante el proceso de extracción, el ADN se une a las perlas de sílice en la columna en un entorno

ácido, lo cual preserva los ácidos nucleicos debido a su afinidad por el medio. El uso de columnas de sílice permite un procesamiento rápido y simultáneo de múltiples muestras (Vinueza-Espinosa et al., 2020).

El tiempo de procesamiento varía entre 45 y 90 minutos por muestra, con un costo que oscila entre 15 y 45 dólares por cada una. Esta eficiencia y rapidez en el procesamiento son ventajas significativas del método de extracción mediante columnas de sílice en comparación con otros métodos comerciales (Vélez et al., 2022).

Además, el método de extracción con sílice ofrece otras ventajas. Permite trabajar con volúmenes pequeños y una menor cantidad inicial de muestra. También se ha demostrado que es más eficaz en la recuperación de ADN amplificable por PCR en comparación con otros métodos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la preservación adecuada de los restos es fundamental para garantizar el éxito del análisis molecular. Entre las ventajas adicionales del método de extracción con sílice se encuentran la disminución en la manipulación, la eliminación de inhibidores, la reducción del tiempo y la capacidad de automatización. Estas características hacen que el método sea aún más atractivo en el campo de la investigación científica (Sierra et al., 2017).

Por otro lado, una desventaja del método de extracción con sílice son los altos costos por muestra. Esto se debe a que los equipos y reactivos utilizados en el proceso son costosos. Sin embargo, considerando las ventajas y la eficiencia del método, estos costos pueden justificarse en determinadas situaciones (Vásquez Bonilla, 2019).

Esferas magnéticas

La obtención de ácidos nucleicos (ARN y ADN) a través del uso de perlas magnéticas se basa en la complementariedad de la hibridación entre el ácido nucleico y las perlas, lo que permite su posterior aislamiento mediante la aplicación de campos magnético. El proceso de extracción con perlas magnéticas puede llevarse a cabo en un período de tiempo más breve, lo que facilita su automatización y ahorra tiempo. También se ha investigado el uso de sistemas de microchip con perlas magnéticas, que han demostrado un rendimiento superior en la extracción de ADN mitocondrial en comparación con los kits comerciales (Chang et al., 2010).

Sin embargo, es importante tener en cuenta algunas desventajas de este enfoque. Por un lado, se requiere contar con equipos especializados para la manipulación de las perlas magnéticas y la implementación de un sistema micro fluidos para la extracción. Además, se ha observado en algunos estudios que se recupera menos ADN en comparación con otros métodos de extracción (Zander et al., 2017). A pesar de estas limitaciones, el uso de perlas magnéticas sigue siendo una opción prometedora para la extracción eficiente y rápida de ADN en diversas aplicaciones científicas (Sierra et al., 2017).

Tabla 1. Comparación entre métodos de extracción (Sierra et al., 2017a) (Vélez et al., 2022)

	Fenol-cloroformo	Columnas de sílice	Prepfilier
Tiempo	45 y 480 minutos	45 y 90 minutos	45 y 480 minutos
Costo	0,5 a 2,0 dólares	15 y 45 dólares por cada una	0,75 a 1,25 dólares
% ADN	38 %	39,5%	16.3%

Resinas quelantes

El Chelex, una resina con propiedades quelantes, desempeña un papel crucial en la extracción de ADN al protegerlo durante el proceso de ebullición y eliminar metales pesados que podrían dañarlo. Su capacidad para atrapar iones metálicos polivalentes es fundamental para preservar la integridad del ADN durante la extracción, actuando como un intercambiador de iones que evita la ruptura del ADN durante la amplificación por PCR. Posteriormente, el ADN se recupera del sobrenadante mediante centrifugación. El método Chelex-100, por su parte, se destaca por ser simple, económico y efectivo, basándose en el intercambio iónico para unir iones de metales de transición (Burgos et al., 2019).

Además, el método Chelex tiene beneficios potenciales en el análisis forense, ya que simplifica el proceso de extracción, reduce la posibilidad de contaminación y es menos probable que contenga inhibidores de la PCR. A pesar de sus ventajas, el método Chelex presenta limitaciones, como su dificultad para eliminar inhibidores de la PCR en muestras complejas debido a la ausencia de pasos de purificación. Además, puede ser menos eficiente en muestras de baja calidad o con cantidades muy reducidas de ADN, lo que afecta la pureza

del ADN extraído. Asimismo, puede no ser apropiado para ciertos tipos de muestras, como tejidos mineralizados, donde otros métodos podrían ser más adecuados (Walsh et al., 2018).

FTA

El papel FTA, un material absorbente basado en celulosa contiene cuatro sustancias químicas diseñadas para proteger el ADN de la degradación causada por nucleasas y para preservar el papel de crecimiento bacteriano. Esto hace que el ADN en papel FTA sea estable a temperatura ambiente durante varios años. Además, estas tarjetas están impregnadas con tampones, detergentes y agentes quelantes que facilitan la extracción de ADN (ICMP, 2022).

Este proceso está ganando atención en la comunidad forense debido a la reducción de costos al eliminar pasos como la extracción, purificación y cuantificación del ADN, así como a la prevención de la acción de agentes degradantes durante estos procesos. Mientras que el método convencional de secuenciación de ADN mitocondrial implica varios pasos, como extracción, purificación, amplificación, secuenciación y purificación final de los productos secuenciados, este estudio sustituyó el paso de extracción por un lavado de 30 minutos de gotas de sangre FTA (Kitpipit et al., 2013). Sin embargo, una desventaja importante del papel FTA es que no permite la cuantificación del ADN, lo que puede afectar la sensibilidad de la PCR. Además, la calidad de las muestras puede influir en la cantidad de productos de PCR, lo que podría limitar la eficiencia del método (Burgos et al., 2019).

DIFERENTES MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN

Para secuenciar el genoma mitocondrial, existen dos opciones disponibles. La primera opción implica secuenciar únicamente la región de control, utilizando cebadores específicos para

amplificar toda esta región. La segunda opción es realizar una secuenciación masiva paralela para abordar el genoma completo.

En el caso de la secuenciación masiva paralela de genomas mitocondriales completos, el proceso se lleva a cabo en dos etapas de PCR multiplex (MPX1, MPX2) (Phillips et al., 2014). En la primera etapa, se amplifican fragmentos del genoma mitocondrial utilizando cebadores diseñados específicamente para cubrir todas las regiones del genoma, Posteriormente, en la segunda etapa de PCR, se generan un total de 62 amplicones de PCR con un rango de tamaño que oscila entre 300 y 500 pb (Parson et al., 2015).

Tabla 2. cebadores de regiones hipervariables (Crespillo et al., 2004)

Totalidad de la región de control	L15879 y H727
Región hipervariable I	L15997 y H16365
Región hipervariable II	L048 y H408

Tabla 3. Cebadores de amplificación y secuenciación para amplicones de ADNmt que cubren toda la región de control mitocondrial (Berger & Parson, 2009)

Tamaño del amplicón (pb)	Nombre del cebador	Rango de cebadores
444	F15989	15,989–16,008
	R16433	16,412–16,433
312	F16197	16,197–16,221
	R16509	16,490–16,509

299	F16450	16,450–16,470
	R180	156–180
351	F109	109–132
	R460	440–460
282	F317	317–338
	R599	580–599

Las ventajas de la PCR estándar para la amplificación de ADN mitocondrial incluyen su alta sensibilidad, especificidad y eficiencia en la amplificación de secuencias cortas de ADN mitocondrial. Esta técnica se ha establecido como una herramienta ampliamente utilizada y estandarizada en laboratorios de investigación y diagnóstico. No obstante, la PCR estándar presenta algunas desventajas, como el riesgo de contaminación cruzada, la necesidad de cebadores específicos y la susceptibilidad a inhibidores que pueden estar presentes en las muestras de ADN (Kovacevic Grujicic et al., 2012).

Los inhibidores de la PCR presentes en las muestras pueden ser compuestos orgánicos del suelo, como ácidos húmicos y fúlvicos (Höss et al., 1996), así como subproductos de la degradación orgánica o remanentes de reactivos usados en la extracción de ADN. Además, residuos derivados de la porfirina o sus productos de degradación podrían ser responsables de la actividad inhibidora de la PCR (Tuross, 1994). Se ha mencionado también la existencia de sustancias inhibidoras cuya naturaleza y mecanismos de acción aún no se comprenden completamente. Estos inhibidores pueden interferir en etapas posteriores de la identificación genética. El ácido húmico, un componente común del suelo ha demostrado ser un inhibidor potente de la PCR debido a su capacidad para interferir con las enzimas biológicas, incluida

la polimerasa utilizada en la reacción de PCR (Sidstedt et al., 2015). Además, se ha observado que los ácidos húmicos son compuestos orgánicos muy comunes en el suelo y pueden acompañar al ADN durante el proceso de extracción, siendo inhibidores muy efectivos de la reacción de PCR. Tanto el ácido húmico como la melanina, otro inhibidor conocido, se encuentran presentes en muestras como restos de esqueletos y cabello telógeno, respectivamente (Mita et al., 2020).

Los inhibidores de la PCR también pueden incluir lesiones en las bases de ADN, como los derivados de las pirimidinas, que tienen la capacidad de bloquear la elongación de la cadena de ADN por parte de las polimerasas de ADN. Aunque otros tipos de daño, como los productos de oxidación de purinas, no parecen correlacionarse con la incapacidad para recuperar secuencias de ADN, se ha observado que las muestras con bajos niveles de daño y de las cuales se pudo amplificar ADN provenían de regiones donde predominaban las bajas temperaturas durante el período de entierro (Höss et al., 1996).

MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN

Sanger

La metodología de secuenciación de Sanger se emplea para investigar el ADN mitocondrial en muestras forenses, enfocándose en la determinación de la secuencia de nucleótidos. Este procedimiento se basa en la utilización de cebadores específicos para amplificar y secuenciar las regiones hipervariables del ADNmt (Luce et al., 2009). Una de las ventajas de esta técnica radica en su validación según las pautas establecidas por el Grupo de Trabajo Científico sobre Métodos de Análisis de ADN (SWGDM), lo que garantiza su fiabilidad y precisión en el análisis forense (Wang et al., 2012). Asimismo, su aplicabilidad se extiende a muestras de

cabello y hueso, ampliando así su utilidad en diversos tipos de evidencia. Además, la secuenciación de Sanger es conocida por su alta precisión en la identificación de polimorfismos de nucleótidos en secuencias de ADNmt, lo que la convierte en un método confiable para genotipificar e identificar marcadores del linaje materno, especialmente en los casos en los que el análisis STR puede tener una eficiencia limitada (Mita et al., 2020).

La secuenciación de Sanger se ha utilizado ampliamente para analizar regiones específicas del ADN mitocondrial y ha sido reconocida como el estándar para la secuenciación de ADN. Sin embargo, presenta limitaciones importantes, como la incapacidad para analizar múltiples polimorfismos en una sola reacción, genotipado de baja resolución, pérdida de información genómica en muestras de ADN degradadas y análisis de mezclas. Es fundamental destacar que este método puede ser menos sensible en comparación con otras técnicas, lo que dificulta la detección en muestras con baja cantidad de ADNmt. Además, la secuenciación de Sanger puede resultar más costosa y requerir más tiempo en comparación con métodos más modernos (Elizabeth A Lyons et al., 2013). Estas limitaciones también se reflejan en la capacidad limitada de la secuenciación de Sanger para proporcionar una amplia información genética y un poder de discriminación en comparación con las técnicas de masiva en paralelo (MPS). Además, la secuenciación de Sanger puede ser susceptible a la heteroplasmia, lo que puede afectar la precisión de los resultados, especialmente en la identificación de polimorfismos en muestras con niveles bajos de ADNmt (Avila et al., 2019).

SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA

La comunidad forense ha limitado históricamente el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) a las regiones hipervariables I y II (HVI y HVII), debido en parte a las dificultades técnicas para secuenciar todo el genoma mitocondrial utilizando la secuenciación de Sanger (Melton

et al., 2012). Sin embargo, la secuenciación masiva paralela (MPS) ha superado estas limitaciones al simplificar la secuenciación del genoma completo (Parson et al., 2013). Los MPS puede secuenciar millones de fragmentos a la vez, lo que permite la secuenciación de las 16,569 bases del ADNmt (Avila et al., 2019).

Estudios han demostrado que la secuenciación del genoma completo del ADNmt aumenta significativamente la proporción de haplotipos únicos en comparación con el uso solo de las regiones HVI/HVII (Cuenca et al., 2020). Esta mayor resolución y capacidad para identificar haplotipos únicos hacen que el análisis del genoma completo del ADNmt sea una herramienta eficaz en comparación con otros métodos (Chaitanya et al., 2015). Además, MPS ofrece ventajas como el alto rendimiento, la automatización del procesamiento y la capacidad de genotipificar simultáneamente una cantidad significativa de muestras (Brandhagen et al., 2020). A pesar de sus ventajas, MPS también presenta desafíos, como restricciones técnicas y la complejidad del análisis de datos, especialmente en la distinción de variantes de bajo nivel y el manejo de grandes cantidades de datos (Syndercombe Court, 2021). Aunque inicialmente puede ser más costoso que la secuenciación de Sanger, el MPS se considera un método superior en términos de capacidad de secuenciación masiva y resolución filogenética, convirtiéndose en la preferencia para el análisis forense de ADNmt (Yang et al., 2014).

Las directrices de la Sociedad Internacional de Genética Forense proporcionan pautas actualizadas para la tipificación del ADNmt, reflejando la evolución de la tecnología y las prácticas en este campo. Desde 2005, los métodos de MPS, han permitido secuenciar grandes cantidades de ADN en tiempos relativamente cortos, destacando el avance y la importancia de estas tecnologías en la investigación forense (Bruijns et al., 2018).

ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL

Una vez se obtiene la secuencia del ADN mitocondrial, se compara con una referencia conocida como la Secuencia Revisada de Cambridge (rCRS). Esta referencia, también llamada *Cambridge Reference Sequence* (CRS) o secuencia de Anderson (Anderson et al. 1981), se estableció como el estándar universal para evaluar la variabilidad del ADN mitocondrial. Cada base del genoma mitocondrial se etiqueta con un número según su posición en el genoma, tomando como punto de partida una posición cercana al origen de replicación de la cadena H, siendo esta base la posición 1 y la base anterior la posición 16569.

Se ha verificado que la secuencia de Anderson contenía errores, especialmente en la región codificante. Por lo tanto, actualmente se emplea la versión corregida de esta secuencia, conocida como *Revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) (Andrews et al., 1999) como la referencia estándar. Cada variación de un solo nucleótido en la secuencia obtenida se registra y analiza, y el conjunto de estas variaciones define un haplotipo mitocondrial. En este proceso, se señala la posición de la variación y se describe el tipo de cambio en comparación con la secuencia de referencia.

Este método de comparación se utiliza en el campo de la genética forense para establecer posibles relaciones entre muestras de evidencia y sospechosos. Se compara el ADN mitocondrial de las muestras con la secuencia de Cambridge para determinar si hay una coincidencia genética y así establecer vínculos entre la muestra y el sospechoso. Además de identificar los haplotipos mitocondriales (Parson et al., 2015).

Una vez obtenida la secuencia de ADN, se carga en una plataforma en línea especializada para su análisis. En la actualidad, hay diversas plataformas disponibles para la comparación del ADN mitocondrial, pero una de las más reconocidas es EMPOP (<https://empop.online/>). Este banco de datos, ampliamente reconocido como una fuente primordial de haplotipos de

ADN mitocondrial, fue originalmente concebido como una referencia poblacional (Salas et al., 2001). Su objetivo inicial era respaldar la evaluación global de pruebas de ADNmt. EMPOP cumple una variedad de roles; no solo actúa como un depósito de información sobre secuencias de ADN mitocondrial, sino también como un mecanismo de garantía de calidad para científicos activos en la genética forense y campos afines. La principal razón detrás de la contribución de secuencias de ADN mitocondrial a EMPOP radica en su pertinencia para aplicaciones forenses. Estas secuencias resultan útiles en la identificación y comparación de muestras de ADN en investigaciones criminales y procedimientos judiciales (Corach, 2009).

Al acceder a una base de datos, los investigadores forenses pueden contrastar las secuencias de ADN mitocondrial de una muestra desconocida con aquellas almacenadas en la base de datos para determinar su origen y posibles conexiones con otras muestras. A pesar de la existencia de múltiples bases de datos, EMPOP sobresale como la más prevalente debido a su rigurosa validación de datos genéticos, consolidándose, así como una herramienta esencial en la investigación tanto genética como forense (Corona & Estrada, 2021).

DISCUSIÓN

Tradicionalmente, se ha utilizado la extracción orgánica con fenol-cloroformo como principal método de purificación; no obstante, dado el alto grado de toxicidad de los reactivos y el tiempo que se toma el procedimiento se han desarrollado métodos alternativos, como la extracción con sílice o con perlas magnéticas, los cuales permiten trabajar con volúmenes pequeños y menor cantidad (Sierra et al., 2017a). Un estudio comparativo de protocolos de extracción de ADN encontró que el protocolo de extracción con fenol-cloroformo fue

eficiente para eliminar los inhibidores de la PCR, por otro lado, en otra investigación se estableció que el protocolo de extracción con sílice también fue eficiente para eliminar los inhibidores de la PCR (Vélez et al., 2022). Se ha reportado que el método de sílice logra una recuperación de ADN del 45.7%, mientras que el método de extracción con fenol-cloroformo alcanza una recuperación del 39%, y el método de perlas magnéticas alcanza una recuperación del 16.3%. (Sierra et al., 2017). Esta eficacia en la recuperación del material genético posiciona al método de extracción de sílice como superior a otros métodos para la extracción de ADN como el fenol-cloroformo o las perlas magnéticas.. Esto se debe a su capacidad para una mejor recuperación del ADN, una eliminación más eficiente de inhibidores y una reducción en el número de pasos de manipulación, lo que disminuye el riesgo de contaminación cruzada (Vinueza-Espinosa et al., 2020).

Tanto el método de extracción con resina Chelex como el uso de tarjetas FTA son adecuados para muestras de referencia debido a la eliminación de pasos ya que la concentración de ADN es suficiente y no se considera necesario realizar una purificación o cuantificación antes de su uso en análisis posteriores porque las muestras suelen estar bien conservadas y controladas, lo que hace menos efectivos para muestras complejas. Sin embargo, el método de extracción Chelex ha demostrado ser simple, rápido y no requiere solventes orgánicos. Es eficiente para la amplificación por PCR de ADN de semen y sangre seca en tela, con resultados comparables a los métodos tradicionales de extracción con fenol-cloroformo. La resina Chelex también ha demostrado ser efectiva en la extracción de ADN de muestras forenses expuestas a diversas sustancias y ha mostrado concordancia en la genotipificación de muestras preparadas tanto con Chelex como con extracción convencional de fenol-cloroformo. En estudios de concordancia, se encontró que los genotipos obtenidos utilizando

el método Chelex y el método de extracción con fenol-cloroformo fueron idénticos para todas las muestras probadas. Pero cuando se tienen muestras complejas los métodos como el fenol-cloroformo, las columnas de sílice o las perlas magnéticas pueden ser más efectivos para obtener un ADN (Walsh et al., 2018).

Por otra parte, la secuenciación por Sanger, aunque históricamente ha sido una herramienta fundamental en la genómica, presenta ciertas limitaciones en comparación con la secuenciación masiva paralela (MPS) ya que tiene la capacidad de secuenciar millones de fragmentos de ADN simultáneamente, lo que permite una mayor eficiencia y la posibilidad de utilizar códigos de barras moleculares para la multiplexación de muestras. Esta tecnología supera las limitaciones técnicas asociadas con la secuenciación de Sanger, lo que la hace más versátil y adecuada para aplicaciones de alto rendimiento (Cui et al., 2013).

A pesar de que la secuenciación de Sanger puede ser más económica en términos de costos directos por muestra, la MPS ofrece una mayor rentabilidad al secuenciar genomas completos de manera más eficiente. Esto resulta en una mayor resolución filogenética y una mejor capacidad de discriminación, lo que la convierte en la opción preferida para estudios que requieren un análisis exhaustivo y detallado de la información genómica.

CONCLUSIONES

El método de columnas de sílice ofrece una eficiencia superior en comparación con el método tradicional de fenol-cloroformo, mostrando una mejor recuperación de material genético, eliminación más eficiente de inhibidores y menos pasos de manipulación, lo que reduce el riesgo de contaminación. En términos de secuenciación de ADN, la tecnología de próxima generación (MPS) supera las limitaciones de la secuenciación por Sanger en términos de

eficiencia, capacidad de multiplexación y resolución filogenética. Aunque la secuenciación por Sanger puede ser más económica en términos de costos directos, la MPS ofrece una mayor rentabilidad al permitir el análisis exhaustivo y detallado de la información genómica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a los miembros del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses por brindarme la oportunidad de realizar mi pasantía en su institución.

CONTRIBUCIONES DE AUTORÍA

Karen Español-Contreras contribuyó activamente en la búsqueda de información y en la redacción del texto. Erika Salguero se encargó de la revisión exhaustiva de la información y de buscar artículos relacionados con el tema. Ana Paez-Vila y Martínez-Garro, por su parte, seleccionaron el tema de investigación y participaron en la revisión crítica de la información recopilada.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

Alonso, A., Martín, P., C, A., P, G., Aguirre, A., & Fernández, K. (2012). La identificación genética de víctimas de la Guerra Civil Española: La experiencia del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. *Boletín Galego de Medicina Legal e Forense*, 18, 117-124.

- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [5]. *Nature Genetics*, 23(2), 147. Scopus. <https://doi.org/10.1038/13779>
- Avila, E., Graebin, P., Chemale, G., Freitas, J., Kahmann, A., & Alho, C. S. (2019). Full mtDNA genome sequencing of Brazilian admixed populations: A forensic-focused evaluation of a MPS application as an alternative to Sanger sequencing methods. *Forensic Science International: Genetics*, 42, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.07.004>
- Ballard, D. (2016). Analysis of Mitochondrial Control Region Using Sanger Sequencing. In W. Goodwin (Ed.), *Forensic DNA Typing Protocols* (pp. 143-155). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_12
- Bandelt, H.-J., & Salas, A. (2012). Current Next Generation Sequencing technology may not meet forensic standards. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 143-145. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.004>
- Berger, C., & Parson, W. (2009). Mini-midi-mito: Adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples.

Forensic Science International: Genetics, 3(3), 149-153.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.01.011>

Brandhagen, M. D., Just, R. S., & Irwin, J. A. (2020). Validation of NGS for mitochondrial DNA casework at the FBI Laboratory. *Forensic Science International: Genetics*, 44, 102151. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102151>

Brandstätter, A., & Parson, W. (2003). Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts—A matter of the amplification strategy? *International Journal of Legal Medicine*, 117(3), 180-184. <https://doi.org/10.1007/s00414-002-0350-7>

Bruijns, B. B., Tiggelaar, R. M., & Gardeniers, H. (2018). The Extraction and Recovery Efficiency of Pure DNA for Different Types of Swabs. *Journal of Forensic Sciences*, 63(5), 1492-1499. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13837>

Burgos, G., Flores-Espinoza, R., Ruiz-Pozo, V. A., & Villacrés Granda, I. (2019). Efficient preservation of DNA extracted from blood in FTA cards by Chelex method. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 539-541. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.082>

Chaitanya, L., Ralf, A., van Oven, M., Kupiec, T., Chang, J., Lagacé, R., & Kayser, M. (2015). Simultaneous Whole Mitochondrial Genome Sequencing with Short Overlapping Amplicons Suitable for Degraded DNA Using the Ion Torrent Personal Genome Machine. *Human Mutation*, 36(12), 1236-1247. <https://doi.org/10.1002/humu.22905>

Chang, C.-M., Chiou, L.-F., Lin, C.-C., Shieh, D.-B., & Lee, G.-B. (2010). Three-dimensional microfluidic chip for the extraction of mitochondrial DNA. *Microfluidics and Nanofluidics*, 9(2), 489-498. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0565-8>

- Corach, D. (2009). *Bases de datos de secuencias mitocondriales: Relevante contribución de la Antropología a la Investigación Forense*. IX Jornadas Nacionales de Antropología Biológica (Puerto Madryn, 20 al 23 de octubre de 2009).
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/15977>
- Corona, S. V., & Estrada, M. G. (2021). *El ADN mitocondrial: Una alternativa útil para la identificación forense*.
- Coronel Guzmán, M. A. (2023). *Caracterización filogenética del ADN mitocondrial (ADNmt) de restos óseos provenientes de 5 poblaciones precolombinas del Bajo Magdalena, Colombia*. [Trabajo de grado - Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/85257>
- Crespillo, M., González, R., & Villarreal, J. (2011). Aprendizaje y reflexiones de la identificación de cadáveres mediante marcadores genéticos monoparentales (ADN mitocondrial, cromosoma Y). A propósito de un caso. *Fuel and Energy Abstracts*, 37, 17-21. [https://doi.org/10.1016/S0377-4732\(11\)70056-6](https://doi.org/10.1016/S0377-4732(11)70056-6)
- Crespillo, M., Paredes, M., Arimany, J., Guerrero, L., & Valverde, J. L. (2004). Guerra Civil Española (1936-1939): Identificación de restos humanos procedentes de fosas comunes en Cataluña mediante análisis de ADN Mitocondrial. A propósito de un caso. *Cuadernos de Medicina Forense*, 38, 37-46.
- Cruz Hernández, J. E. (2019). *La genética forense en la Fiscalía General de la República, obtención de perfiles genéticos y el ADN mitocondrial*.
<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/25991>
- Cuenca, D., Battaglia, J., Halsing, M., & Sheehan, S. (2020). Mitochondrial Sequencing of Missing Persons DNA Casework by Implementing Thermo Fisher's Precision ID

mtDNA Whole Genome Assay. *Genes*, 11(11), Article 11.

<https://doi.org/10.3390/genes11111303>

Cui, H., Li, F., Chen, D., Wang, G., Truong, C. K., Enns, G. M., Graham, B., Milone, M., Landsverk, M. L., Wang, J., Zhang, W., & Wong, L.-J. C. (2013). Comprehensive next-generation sequence analyses of the entire mitochondrial genome reveal new insights into the molecular diagnosis of mitochondrial DNA disorders. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 15(5), 388-394. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.144>

Elizabeth A Lyons, Melissa K Scheible, & Sturk-Andreaggi, K. (2013). *A high-throughput Sanger strategy for human mitochondrial genome sequencing* / *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-881>

Ferrer, J. M. Q., Govea, T. C. P., & Fuentes, L. B. B. (2019). Frecuencia de heteroplasmia en las regiones hipervariables HVI y HVII del ADN Mitocondrial en una muestra de la población de Maracaibo, Venezuela. *Revista de Ciencias Forenses de Honduras*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.5377/rcfh.v5i2.8885>

Ferrer, J. quintero, Fuentes, L. B., & Govea, T. P. (2018). *Análisis de la diversidad genética de las regiones HVI y HVII del genoma mitocondrial en una muestra de la población de Maracaibo, Venezuela* / *Genetic diversity of HVI and HVII mitochondrial genome regions in a population sample of Maracaibo, Zulia state, Venezuela*. <https://core.ac.uk/reader/235925280>

Gazi, N. (2018). *Mitochondrial DNA and Methods for Forensic Identification*.

<https://doi.org/10.19080/JFSCI.2018.09.555755>

- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., & Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, *24*(7), 1304-1307.
- ICMP. (2022). *Manual sobre Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos Humanos No Identificados*. <https://www.icmp.int/es/?resources=manual-sobre-metodos-de-extraccion-de-adn-de-restos-oseos-humanos-no-identificados>
- Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., Linacre, A., Lapwong, Y., & Chotigeat, W. (2013). Low-cost direct PCR for aged and processed wildlife sample analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *4*(1), e71-e72.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.036>
- Kovacevic Grujicic, N., Davidović, S., Takić Miladinov, D., Marija, M., & Stevanovic, M. (2012). Direct PCR amplification of the HVSI region in mitochondrial DNA from buccal cell swabs. *ARCHIVES OF BIOLOGICAL SCIENCES*, *64*, 851-858.
<https://doi.org/10.2298/ABS1203851G>
- Luce, C., Montpetit, S., Gangitano, D., & O'Donnell, P. (2009). Validation of the AMPFISTR MiniFiler PCR amplification kit for use in forensic casework*. *Journal of Forensic Sciences*, *54*(5), 1046-1054. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01099.x>
- Melton, T., Holland, C., & Holland, M. (2012). Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practice and Future Potential. *Forensic Science Review*, *24*(2), 101-122.
- Mita, Y., Fukagawa, T., Watahiki, H., Kitayama, T., Fujii, K., Mizuno, N., & Sekiguchi, K. (2020). Developmental validation for Sanger sequencing of HV1 and HV2 in mitochondrial DNA. *Forensic Science International: Reports*, *2*, 100159.
<https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100159>

- Ovchinnikov, I. V., Malek, M. J., Kjelland, K., & Drees, K. (2016). Whole Human Mitochondrial DNA Sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1420*, 157-171. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_13
- Parson, W., Huber, G., Moreno, L., Madel, M.-B., Brandhagen, M. D., Nagl, S., Xavier, C., Eduardoff, M., Callaghan, T. C., & Irwin, J. A. (2015). Massively parallel sequencing of complete mitochondrial genomes from hair shaft samples. *Forensic Science International. Genetics, 15*, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.009>
- Parson, W., 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). *Forensic Science International. Genetics, 7(5)*, 543-549. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.06.003>
- Parsons, T. J., & Coble, M. D. (2001). Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croatian Medical Journal, 42(3)*, 304-309.
- Pérez Sánchez, G. (2022). *Método para la extracción y purificación de ADN en restos óseos humanos, para el estudio de los polimorfismos, mediante el kit de amplificación Identifiler (16 STR)*. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16887>
- Phillips, N. R., Sprouse, M. L., & Roby, R. K. (2014). Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay. *Scientific Reports, 4(1)*, 3887. <https://doi.org/10.1038/srep03887>
- Prieto Solla, L. (2004). *Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: Valoración de estrategias y resultados*. Universidad

Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

<https://hdl.handle.net/20.500.14352/55229>

Salas, A., Lareu, M. V., & Carracedo, A. (2001). Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: A case report. *International Journal of Legal Medicine*, 114(3), 186-190. <https://doi.org/10.1007/s004140000164>

Sidstedt, M., Jansson, L., Nilsson, E., Noppa, L., Forsman, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2015). Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 487, 30-37.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.002>

Sierra, W. U., Castillo Sabogal, H. del, & Espitia-Ortiz, T. (2017a). Protocolo unificado de digestión y descalcificación de tres métodos de extracción de ADN de restos humanos. *Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*, 41(161), 447-455.

Sierra, W. U., Castillo Sabogal, H. del, & Espitia-Ortiz, T. (2017b). Protocolo unificado de digestión y descalcificación de tres métodos de extracción de ADN de restos humanos. *Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*, 41(161), 447-455.

Stoljarova, M., King, J. L., Takahashi, M., Aaspõllu, A., & Budowle, B. (2016). Whole mitochondrial genome genetic diversity in an Estonian population sample. *International Journal of Legal Medicine*, 130(1), 67-71.

<https://doi.org/10.1007/s00414-015-1249-4>

Syndercombe Court, D. (2021). Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerging Topics in Life Sciences*, 5(3), 415-426. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210204>

- Takayanagi, K., Asamura, H., Tsukada, K., Ota, M., Saito, S., & Fukushima, H. (2003). Investigation of DNA extraction from hair shafts. *International Congress Series*, 1239, 759-764. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00582-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00582-4)
- Torres, C. A. M. (2009). Análisis de la variación en las secuencias del ADNMT humano en individuos residentes de la región Cundi-boyacense. *Antistio: Revista del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Colombia*, 1(3), Article 3. <https://doi.org/10.16925/cf.v1i3.1386>
- Tuross, N. (1994). The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50(6), 530-535. <https://doi.org/10.1007/BF01921721>
- Valverde, L., Cardoso Martín, S., Palencia Madrid, L., Martínez de Pancorbo Gómez, M., López Quintana, J. C., & Guenaga Lizasu, A. (2011). Análisis de ADN mitocondrial en los restos humanos de la cueva de Santimamiñe (Kortezubi, Bizkaia). *Kobie .Bizkaiko Arkeologi Indusketak = Excavaciones Arqueológicas en Bizkaia*, 1, 383-392.
- Vásquez Bonilla, M. M. (2019). *Comparación de 5 métodos de extracción de ADN genómico de sangre* [bachelorThesis, Quito: Universidad de las Américas, 2019]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/11904>
- Vélez, D. L. G., Hernández, J. A. C., & Gil-Villa, A. M. (2022). Secuenciación de Nueva Generación: ¿Es Factible su Implementación en el Ámbito Forense Colombiano? *Memorias Forenses*, 5, Article 5. <https://doi.org/10.53995/25390147.1012>
- Vinueza-Espinosa, D. C., Santos, C., Martínez-Labarga, C., & Malgosa, A. (2020). Human DNA extraction from highly degraded skeletal remains: How to find a suitable method? *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.202000171>

- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (2018). *Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material | BioTechniques*.
<https://www.future-science.com/doi/10.2144/000114018>
- Wang, D. Y., Chang, C.-W., Lagacé, R. E., Calandro, L. M., & Hennessy, L. K. (2012). Developmental validation of the AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifiler $\text{\textcircled{R}}$ Plus PCR Amplification Kit: An established multiplex assay with improved performance. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), 453-465. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01963.x>
- Yang, Y., Xie, B., & Yan, J. (2014). Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 12(5), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.09.001>
- Zander, J., Rothe, J., Dapprich, J., & Nagy, M. (2017). New application for haplotype-specific extraction: Separation of mitochondrial DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*, 29, 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.05.001>