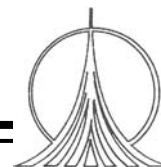




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**PRINCIPALES MÉTODOS DE ANÁLISIS
DE SEMEN EN LOS CASOS DE
VIOLACIONES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA
P R E S E N T A
ESTRADA FRAGOSO CATALINA ARACELI**

MÉXICO, D.F. MARZO DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ASESOR
JOSÉ ÁNGEL ROJAS ZAMORANO



**A Dios por
obsequiarme
la vida...**

**Especialmente a
mis padres Clarita y
José por su apoyo,
ejemplo de vida y
valiosa herencia**

**A mis hermanos, Irma,
Martín, Angélica, Juan, y Karina,
que jamás dejaron de
apoyarme en cualquier
situación**

**A mi familia Jesús, Arturo y
Aurora por que su amor me
hizo más fuerte cada día**

**A la Universidad Nacional Autónoma de
México, Profesores y Amigos
por cambiar mi vida**

**Por su apoyo a los
Maestros,
José Angel Rojas
Zamorano,
Valentín Islas Pérez**

| CONTENIDO | | PÁG. |
|---|--|-------------|
| INTRODUCCIÓN | | 6 |
| CAPÍTULO I. CONSIDERACIONES GENERALES | | |
| ANTECEDENTES HISTÓRICOS | | 12 |
| MARCO TEÓRICO | | 14 |
| OBJETIVOS | | 23 |
| PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN. | | 24 |
| MÉTODOS EMPLEADOS. | | 24 |
| CAPÍTULO II. LA MUESTRA, SU RECOPIACIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS | | |
| PROCEDIMIENTO DE RECOPIACIÓN DE LA MUESTRA | | 26 |
| a) La importancia de los indicios en el lugar de los hechos | | 26 |
| b) El lugar de los hechos | | 28 |
| c) Aislamiento y evaluación de los riesgos de contaminación | | 31 |
| d) Consideraciones preliminares para la recolección de muestras e indicios de naturaleza biológica | | 39 |
| e) Recolección y preservación de los diferentes tipos de muestras biológicas | | 42 |
| EL SEMEN Y SUS CARACTERÍSTICAS ÚTILES PARA SU ANÁLISIS EN EL LABORATORIO | | |
| • Manchas seminales y semen encontrados en el lugar de los hechos | | 44 |
| • Manchas seminales sobre objetos movibles | | 44 |
| • Manchas de semen en objetos grandes que se pueden cortar | | 45 |

| | |
|--|--------|
| • Manchas seminales sobre superficies no absorbentes y fijas | 45 |
| • Muestras de semen en la víctima | 45 |
| • Otras Manchas | 46 |
| MUESTRAS ADICIONALES QUE COMPLEMENTAN EL ANÁLISIS DE SEMEN | 46 |
| MUESTRAS DE MATERIAL ADICIONAL REQUERIDOS PARA COMPLEMENTAR EL ANÁLISIS DEL SEMEN | 48 |
| EFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE LA INTEGRIDAD DEL ADN | 51 |
| CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LABORATORIO EN EL ANÁLISIS DE SEMEN | |
| EXAMEN MACROSCÓPICO DE LA MANCHA | 56 |
| IDENTIFICACIÓN DE SEMEN | 58 |
| RECOLECCIÓN DE MATERIAL | 60 |
| DIAGNÓSTICO GENÉRICO | 61 |
| EXAMEN MICROSCÓPICO | 61 |
| REACCIÓN DE ESPERMINA Y COLINA | 62 |
| REACCIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA PROSTÁTICA | 63 |
| MÉTODOS INMUNOLÓGICOS | 64 |
| DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO | 65 |
| DIAGNÓSTICO INDIVIDUAL | 65 |
| DIAGNÓSTICO GENÉTICO | 67 |

| | |
|---|------------|
| CRITERIOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN HUMANA | 72 |
| • La Identificación de Individuos | 72 |
| • Conceptos aplicados a personas vivas | 73 |
| • Exámenes generales | 73 |
| | |
| LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS POR TÉCNICAS BIOQUÍMICAS QUE EVALÚAN EL FENOTIPO | 75 |
| • Reseña Histórica | 77 |
| • Múltiples alternativas de análisis de ADN. | 79 |
| • Sistemas basados en diferente longitud de la región variable | 80 |
| – Reacción en cadena de la polimerasa (PCR o Polymerase Chain. Reaction) | 82 |
| – Evaluación de microsatélites | 84 |
| • Sistemas basados en diferencias en las secuencias nucleotídicas | 85 |
| – Variantes genéticas nucleares | 85 |
| – Variantes de ADN mitocondrial | 85 |
| • Evolución metodológica y perspectivas | 86 |
| • Controles de calidad | 88 |
| | |
| CONCLUSIONES | 90 |
| | |
| ANEXOS | 93 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 137 |

INTRODUCCIÓN

La violencia sexual es un fenómeno universal que ataca, indistintamente a mujeres de todas las clases sociales, etnias, religiones y culturas¹⁰. Ocurre en poblaciones de diferentes niveles sociales y económicos, en espacios públicos o privados y en cualquier etapa de la vida de la mujer²⁵. Históricamente los crímenes sexuales han sido utilizados como instrumento de persecución política²⁶. Las naciones civilizadas no admiten la violencia sexual, sin embargo se lleva a cabo en casos de guerra. A pesar de esa práctica, se considera como una grave violación de los derechos humanos. La violencia sexual aún ocurre en conflictos armados contemporáneos, por ejemplo en la guerra de Bosnia y Herzegovina, en Croacia y en el conflicto civil de Liberia. La Organización de las Naciones Unidas estima que en la década de los 90's fueron abusadas por estupro entre 20 a 50 mil mujeres en la antigua Yugoslavia, con la finalidad de promover una "limpieza étnica"¹¹.

La violencia sexual puede ocurrir en cualquier etapa de la vida de la mujer. Sin embargo, la mayoría de los registros existentes demuestran un predominio de esos crímenes en las más jóvenes, principalmente entre los 15 y 25 años de edad⁴⁴. De hecho las adolescentes presentan un riesgo cuatro veces mayor de sufrir violencia sexual que cualquier otro grupo⁷⁴. Se cree que la fuerza física del agresor y la intimidación psicológica aplicada, sean los factores determinantes para neutralizar la resistencia de la víctima. Aproximadamente en 30% de los casos se ha utilizado algún instrumento de amenaza, siendo el más común un arma de fuego²³. La intimidación psicológica sin uso de fuerza física parece ser una forma predominante de intimidación⁷⁴. Las adolescentes y mujeres adultas cuando son abordadas por agresores desconocidos se encuentran en el camino al trabajo o la escuela o se encuentran realizando actividades simples o cotidianas en su comunidad. A pesar de que el abordaje a las mujeres ocurre en espacios públicos, la violencia es practicada lejos de cualquier testigo¹¹. Se debe considerar el alto número de casos de violencia sexual entre mujeres con deficiencia mental, un importante factor de vulnerabilidad. Se estima que el 50% de las deficientes mentales son sexualmente abusadas al

menos una vez en su vida. Se observa un mayor riesgo para que la condición se convierta crónica, principalmente en mujeres discapacitadas con enfermedades mentales severas⁷⁷.

En el delito de violación, existe una dinámica de transferencia indicios biológicos entre víctima, victimario y lugar de los hechos, generalmente es sangre, semen, saliva, cabellos o tejidos. El estudio de estos indicios es de bastante utilidad para estos casos³⁷.

Los resultados de identificación presuntiva y confirmativa del semen en los casos de violación, son los factores determinantes que en muchas ocasiones permiten excluir o incluir a una persona como sospechoso en la comisión de un delito²⁷.

La impartición de justicia en los delitos de índole sexual, en especial la violación, por su naturaleza y consecuencias a la persona y la sociedad, requiere de herramientas (conocimientos y técnicas) adecuadas para auxiliarse en la tipificación del delito, identificación de culpables o exclusión de inocentes. Para la investigación legal es de suma importancia la identificación rápida de manchas de semen, así como, las pruebas específicas de especie, género y las relacionadas a la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), que en ellas puedan realizarse³¹.

La importancia de desarrollar técnicas confiables y rápidas en una investigación legal, hace necesaria la continua modernización de las técnicas y métodos existentes para llevarla a cabo, ya que en muchos casos, de los resultados de tales estudios, depende probar o descartar la participación de una persona en un hecho delictivo³⁵.

De hecho existen procedimientos para el manejo de las manchas o muestras de semen, que nos dan una buena confiabilidad en sus resultados, pero lo cierto es que en el área forense, el estado de las muestras por lo general no es el ideal, llegando incluso a dificultar o invalidar estos resultados³².

El presente trabajo, es un estudio documental en el que se recopiló y organizó la información, referente a la investigación de las manchas de semen, implicadas en delitos sexuales y proporciona información detallada para llevar a cabo la secuencia que debe desarrollarse en las manchas de semen, con la finalidad de proporcionar una herramienta útil para la consulta rápida sobre el tema.

El estudio y seguimiento de las demandas de ataques sexuales, en especial su legitimidad, involucra un aspecto en extremo difícil, con fuertes rasgos emotivos, sociales y feministas. El hecho es que una proporción significativa de las demandas de violación y ataques indecentes notificados a la policía, son falsos³¹.

Sin embargo, contrario a esta afirmación, se encuentra el hecho, por igual cierto, de que solo una minoría de los ataques sexuales reales se informan a las autoridades. Aunque es difícil obtener estadísticas, por la naturaleza de estos delitos, algunos estudios en Estados Unidos de América (EUA) indican que menos de una quinta parte de los ataques sexuales son investigados por la policía⁴².

Una de las razones por la que se niegan a realizar una denuncia, se debe principalmente a que las víctimas o sus familiares saben que se expondrán al trato indigno de la interrogación, del examen médico, la comparecencia en tribunales, el probable ataque a su carácter y forma de vida por parte de la defensa, además de hacer públicos, aspectos que se consideran estrictamente íntimos o vergonzosos para la persona o su familia⁸⁰.

Muchas de las víctimas no están convencidas de reportar los delitos sexuales, pues no existe la confianza, en que la acción legal lleve a la impartición de justicia y castigo del culpable; esto es justificable si tomamos en cuenta, que solo en una fracción de las denuncias, se llega a detener al presunto perpetrador y de éstos, solo una pequeña parte son declarados culpables y encarcelados¹⁰.

El efecto de la violación, retoma mayor importancia, cuando se considera un delito contra la persona y no meramente un encuentro sexual. El trauma provocado por este delito, además de sus consecuencias físicas inmediatas (violencia, vejaciones, mutilaciones, infecciones de transmisión sexual, embarazo, entre otras), puede tener secuelas a largo plazo que comprometen el desarrollo sexual, psicológico, social y personal de la víctima, cuando no le causan la muerte²³.

De hecho en los procesos legales, en ocasiones, la única forma de asegurar que ha existido copula, es la presencia de semen en la vagina, del mismo modo, este puede encontrarse sobre la piel o ropas de la víctima, ano, boca y/o diversas superficies en el lugar de los hechos, en forma de manchas húmedas o secas. De ahí la importancia de determinar, si un indicio es o no semen⁶³.

Entre las manchas que interesan, para el perito se encuentran las de sangre, semen, meconio, heces y orina, rastros en uñas por pelea o resistencia de la víctima, entre otras. Desde hace mucho tiempo se han tratado de estudiar con particular empeño los caracteres físicos y las reacciones químicas, que pueden proporcionar las diversas clases de manchas, para su identificación y para poner a los peritos, en condiciones de satisfacer las preguntas, que les hicieran sobre el particular los jueces. En el pasado, estos conocimientos estaban lejos de satisfacer estas preguntas⁶¹.

Las manchas de semen tienen características aprovechables, para su diferenciación por sobre las demás manchas, por ejemplo la elevada concentración de espermina y colina que dan origen a las reacciones químicas para la identificación de éste. Y por otro lado, todas las células de nuestro cuerpo, contienen, Ácido Desoxirribonucleico (ADN) nuclear, y entre ellas está el espermatozoide, que además es más resistente a los tratamientos de extracción, por su característica proteolítica de su membrana²⁰.

Se abordaron por medio de una investigación bibliográfica, la recopilación relacionada específicamente a semen o esperma, con la finalidad de hacer un

acervo documental que permita conocer los procedimientos de estudio de las manchas de semen, así como los aspectos legales involucrados en este tipo de casos.

Estos estudios, así como, los relacionados a la inmunología, la genética, la historia y evolución de las leyes, nos permiten conocer la importancia de los avances y alcances que la investigación forense implica, en especial en la identificación de las manchas de semen y la recuperación, a partir de estas, de una muestra de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) para su posterior confrontación con la obtenida del presunto responsable del delito²⁰.

La técnica de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) tiene la ventaja, de que las nuevas metodologías son más sensibles y se puede trabajar con muestras críticas (concentraciones de 1ng de ADN puro) lo cual nos da también una alta confiabilidad en caso de no encontrar semen, o bien por que la misma víctima borra al realizar acciones no convenientes, o no realizar su denuncia a tiempo⁵².

Disponer de una metodología para el estudio de indicios es relativamente sencillo, puesto que no requiere de infraestructura especial ni costosa. El problema se presenta cuando se utilizan metodologías relacionadas con el estudio forense del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), puesto que este tipo de pruebas periciales, requieren de infraestructura y equipo especial, que no poseen la mayoría de los laboratorios forenses de nuestro país^{5,10}.

En la actualidad los órganos de justicia, requieren de metodologías en las pruebas periciales, relacionadas con la identificación de cadáveres y personas vivas o violadas, y la genética forense es una potente herramienta para tal fin⁷⁰.

Hoy en día es una necesidad urgente, que las instituciones procuradoras de justicia del país, cuenten con laboratorios de genética forense diseñados y equipados adecuadamente, con personal capacitado al más alto nivel, para realizar investigaciones y pruebas genéticas.

CAPÍTULO I



CONSIDERACIONES GENERALES

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Luis de Hamm, en el año de 1667, fue quien disfrutó de la primicia del asombroso espectáculo que da, la multitud de espermatozoides que en él pululan⁸⁹.

El francés Albert Florence, nacido en 1851, descubrió una de las primeras técnicas para reconocer huellas de líquido seminal; se basaba en el hecho de que, al tratar una muestra de este espécimen con una solución concentrada de yodo alcalino, se producían cristales rómbicos de color rojo parduzco, formados por la colina libre.

Kirchhoff y Bumell (1859) observaron que las manchas de semen adquirirían una fluorescencia azulada bajo la radiación de rayos ultravioleta³³.

Barberio, médico italiano, trató las manchas seminales con solución de ácido pícrico y obtuvo cristales amarillos de picrato de espermina⁶³.

Sin embargo Balthazard, observó que las reacciones de fluorescencia y Barberio aun cuando útiles en algunos casos, no son fiables. Sus resultados no son concluyentes ni característicos: positivos, no permiten afirmar la presencia de esperma; negativos, no autorizan a concluir su ausencia³³.

Fishmall y Lemer en 1953 dan a conocer su método para estimar fosfatasa ácida³³ de origen prostático.

El alemán S. Berg en 1954 describe el empleo del alfa naftil fosfato de calcio que reacciona con el esperma, dejando libre alfa naftol, que a su vez reacciona con dianzil tetrasonio formando un colorante azoico violeta.

Kind reporta una técnica para determinar fosfatasa ácida seminal en 1964 en la Revista Forensic Science⁸⁹.

G. M. Willot en 1972, incluye en la misma revista un procedimiento por el cual el ácido L–tartárico inhibe las fosfatasas seminal y vaginal⁸⁹.

Dos años más tarde, Adams y Brian de la Policía Metropolitana de Londres dan a conocer una técnica electroforética, por medio de la cual, cuando se hayan encontrado resultados positivos por el procedimiento de Willot, es posible diferenciar las fosfatasas de origen prostático y la presente en secreciones vaginales, así como la procedente de vegetales³³.

En el año de 1978, Sensabaugh aísla una proteína específica del semen humano⁴⁸: la proteína P–30 y en 1983, describe un procedimiento para su detección por inmunoensayo.

Indudablemente, el paso decisivo en la Serología Forense en las técnicas innovadoras de este siglo XX es el descubrimiento del DNA celular⁶⁰, 1989, técnica mediante la cual, una vez identificada una muestra de líquido seminal, es posible individualizarla a través de su patrón genético e identificar a un posible violador con un alto poder de confiabilidad.

MARCO TEÓRICO

La violencia contra la mujer puede ser entendida como una relación de poderes que convierte las diferencias entre los sexos en desigualdad. Consiste en la manera por la cual los hombres ejercen control y poder sobre las mujeres, castigándolas y socializándolas dentro de una categoría inferior subordinada⁸⁹. En ese sentido, la violencia sexual constituye una de las más antiguas y amargas expresiones de la violencia de género¹¹.

Actualmente se vive una problemática de inseguridad en nuestra sociedad –agresiva y devastadora– con delitos de toda índole que se realizan a cada momento a nuestro alrededor y los de agresión sexual, son de los más traumáticos y difíciles de superar física y emocionalmente por la víctima⁶³.

La verdadera incidencia de los crímenes sexuales es desconocida, notándose que es una de las condiciones de menor notificación, denuncia y subregistro. Como ejemplo, se calcula que apenas el 16% de las violaciones son comunicadas a las autoridades en los Estados Unidos. En casos de incesto, estos porcentajes no llegan al 5%⁴⁰. Se cree que la mayor parte de las mujeres no denuncia el hecho por vergüenza y humillación sumidas en el miedo de la reacción de sus parejas, familiares, amigos, vecinos y autoridades.

En la mayoría de los hechos delictivos, los fluidos biológicos que se encuentran con mayor frecuencia son la sangre, el semen y la saliva. Estos indicios constituyen una prueba científica del delito, cosa que es un medio de los más seguros de prueba que contemple la legislación penal moderna, por lo cual como químicos en el área forense, tenemos que concientizarnos de la responsabilidad que tiene el analizar correctamente los indicios, tomando en cuenta de que en el laboratorio solo se estudia lo que se envía y que el análisis se inicia sobre el indicio que se recibe, no sobre el que se manda, y que a través de los datos que se obtienen de estos análisis, se puede individualizar al autor de los hechos. Conocer y

manejar las ventajas, desventajas y limitaciones de los indicios biológicos (semen), y de las técnicas que se les realizan, nos permitirán aprovechar al máximo todos y cada uno de ellos. Los resultados obtenidos con la investigación de estos indicios, forman tan solo una parte de la investigación, que es complementaria con los resultados de otros análisis más complejos y completos, como los obtenidos con las técnicas de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) en indicios biológicos; la información que se obtiene de otros, como pueden ser huellas digitales, documentos, armas de todo tipo, entre otros.

Por lo antes expuesto, este trabajo monográfico, tiene la finalidad el ser una herramienta útil de trabajo para los químicos forenses. Se pretende recopilar a los principales métodos y técnicas de análisis de semen que más se utilizan en la actualidad en los laboratorios forenses, así como sus fundamentos para entender sus principios básicos. La importancia en primera instancia, radica en la parte económica, ya que la mayoría de los laboratorios, no tienen la posibilidad de contar con el equipo para pruebas genéticas que hoy en día es el área de mayor innovación para la identificación de personas.

Para poder hablar con precisión y objetividad sobre la violación y otras formas de violencia, es importante entender la naturaleza del delito, los medios de comunicación nos bombardean con mensajes subliminales, en donde el placer sexual es algo de lo cual un hombre debe sentirse orgulloso y hasta han perpetuado el mito de la violación como algo relacionado con la atracción sexual, un delito debido al deseo irreprimible de un desconocido. Sin embargo hay estudios que demuestran que la mayoría de los violadores, conocen a sus víctimas y que, en vez de ser personas solitarias e incapaces de llevar una vida normal, están casados o tienen una compañera sexual habitual⁷.

La policía calcula que solo una de cada 35 violaciones es denunciada: en 1996 menos de la mitad de todos los casos de violación notificados, pasaron a los tribunales y menos del 10% de éstos resultaron en fallos condenatorios¹⁴.

A pesar del reducido porcentaje de denuncias, la agresión sexual es un crimen cada vez más denunciado, comprometiendo a 12 millones de personas cada año en todo el mundo¹⁰. En los Estados Unidos se calcula que ocurre una agresión sexual cada 6 minutos y que una de cada cuatro mujeres experimenta un contacto sexual no consentido durante la infancia o adolescencia⁴⁰. El Centro Nacional de Víctimas y el Centro de Investigación y Tratamiento de Víctimas calculan que puedan haber ocurrido 683 mil violaciones entre mujeres adultas en los Estados Unidos⁶. Una estimación semejante realizada por el Departamento de Justicia de los Estados Unidos muestra 500 mil crímenes sexuales por año⁶⁶. El Centro Nacional para Niños Abusados y Abandonados avalúa que cerca de 200.000 casos anuales de abuso sexual ocurren entre niños y niñas americanas⁴⁰. De hecho todos los estudios consistentes demuestran porcentajes dramáticos e inaceptables, convirtiendo la violencia sexual como un problema complejo de salud pública⁶. Informó la Fiscal de Delitos Sexuales de la Procuraduría General de Justicia del D. F. Margarita Vázquez que en la Ciudad de México se denuncian en promedio, cuatro violaciones al día y la mitad de ellas ocurren en la vía pública.

Según cifras de la Fiscalía, de enero a junio de este año, se han levantado mil 500 denuncias por distintos delitos de tipo sexual, el 40 % de los cuales corresponden a violaciones (600) de las cuales 240 ocurrieron en la vía pública, 122 en transporte público y 2 en microbús; los patrones de agresión ocurren muy temprano, cuando todavía no amanece, o durante la noche de las 20:00 en adelante. La realización de este tipo de delitos en el transporte público va en aumento, ya que en la Ciudad de México se denuncian 10 ataques sexuales en promedio²⁴.

De acuerdo al *Uniform Crime Report* de 1997, aproximadamente 350,000 mujeres reportaron ataques sexuales en este año en los EUA. En 1998 el instituto nacional de justicia y el centro de control de desordenes en mujeres víctimas de violencia en ese país, documentó en un estimado de 302,100 mujeres y 92,7000 hombres, que fueron atacados sexualmente ese año en EUA. Sin embargo las estadísticas están muy por debajo de lo estimado, ya que un gran número de estos casos no son denunciados a la justicia⁴⁰.

En 1993 el senado judicial de EUA, reportó que el 84% de las denuncias no resultaron en la detención del presunto culpable, el 16% restante donde si hubo detenido, solo la mitad fue sentenciado por más de un año de prisión y el 4% nunca fue encarcelado⁴⁰.

La violación y el coito forzado, se utilizan como arma contra la mujer en situaciones bélicas en todo el mundo. Las mujeres que huyen de la guerra, con frecuencia se enfrentan a mayor violencia sexual durante su huida, mientras buscan condiciones de seguridad y sustento para sí mismas y sus familias¹¹.

Hace ya algún tiempo, se han realizado estudios que relacionan los delitos de índole sexual y sus consecuencias a la persona y la sociedad.

Burges Y Holmstrom han definido un síndrome específico del trauma de la violación. Lo dividen en dos etapas: una inmediata o de respuesta aguda, en la cual el estilo de vida de la víctima está perturbada emocionalmente de modo visible, en contraste con “el estilo controlado” en el que aparece tranquila a los ojos del observador casual⁸⁹.

Algunas de las consecuencias tardías son las siguientes¹⁴:

1. Desconfianza hacia las personas. Se evita o se titubea para relacionarse con ellas.
2. A menudo se presenta una variedad de trastornos sexuales, como disfunción sexual y conflictos maritales.
3. Reacciones fóbicas persistentes.
4. Ansiedad y depresión que pueden ser precipitadas por eventos en apariencia no relacionados que de alguna manera revivir el trauma original.
5. Ansiedad persistente y rechazo a exámenes o procedimientos ginecológicos.
6. Suicidio o intentos suicidas.

Esto hace necesario un seguimiento psiquiátrico durante uno o dos años por lo menos. La víctima puede manifestar síntomas de larga duración, y aún el desarrollo de neurosis traumática que requiere tratamiento prolongado¹¹.

La violencia sexual también puede producir otros efectos sobre la salud y el bienestar de las mujeres, aumenta el riesgo en las mujeres de contraer enfermedades de transmisión sexual –entre ellas el SIDA– y embarazos no deseados, el violador pocas veces utiliza el condón en esta acción⁶⁷.

La adquisición de una enfermedad transmisible sexualmente (ETS) como consecuencia de la violencia sexual puede resultar en severas secuelas físicas y emocionales. Entre 28 a 68% de las víctimas de violencia sexual serán afectadas por una ETS⁹.

La infección por HIV representa la principal preocupación para aproximadamente 70% de las víctimas de violencia sexual¹². Los pocos estudios bien conducidos indican la posibilidad de conversión sérica para el HIV entre 0,8 y 2,7%⁶. Ese riesgo es comparable y hasta superior a lo observado en otras formas de exposición sexual única, receptiva o insertiva o en los accidentes laborales con los prestadores de servicios de salud.

Se nota una gran discrepancia en los datos de literatura sobre las tasas de diagnóstico de lesiones físicas. Las lesiones genitales varían entre 5 y 65%, y las extragenitales entre 10 a 80%. No obstante, hay datos consistentes que apuntan que daños físicos comunes en los casos de abuso sexual entre las niñas¹⁰. Se ha encontrado que existen pocos daños físicos, genitales o extragenitales entre todos los grupos étnicos analizados. A pesar de que no se verifica la existencia de casos fatales o traumas severos relevantes, se debe considerar que una parte significativa de los crímenes sexuales pueden terminar en homicidio, principalmente por asfixia mecánica que es la mayor expresión de poder del agresor²³.

Todas estas consecuencias a la persona y por reflejo a la sociedad, hacen necesario la prevención del delito y una de las formas más efectivas para lograr esto es aplicando sentencias severas, pero para llegar a éstas, la investigación debe aportar evidencias basadas en las muestras e indicios relacionadas con el caso, por ejemplo, los biológicos⁸⁸.

Un indicio importante puede ser el semen del agresor encontrado fácilmente en este tipo de casos en forma de mancha. Se entiende por mancha, toda modificación del color, suciedad o adición de una materia extraña, que visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto cualquiera, determinada por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo³⁴.

Para la medicina forense, la investigación de las manchas es de gran valor, sin embargo, se enfrenta al grave problema en esta área: el médico forense no cuenta con los conocimientos suficientes de química, ni con el instrumental de laboratorio necesario para efectuarla, por esta razón, siempre tiene que recurrir al auxilio del laboratorio para poder realizarla¹.

Entre las manchas que se investigan están: calostro, leche materna, meconio, semen, sangre, líquido amniótico, unto sebáceo, materias fecales y orina³³.

Para la mancha de semen, el análisis ideal es con esperma fresco que contienen sus propiedades organolépticas. Sin embargo el examen se realiza cuando ha transcurrido tiempo por muchas causas propias de la investigación. Presentan particular dificultad las manchas lavadas o sucias y contaminadas⁸⁸.

Por otro lado las manchas de esperma solo indican una cosa, eyaculación, espermatorrea o “escurrimiento” seminal, pero nunca podrán indicar por si, si se trata de una violación, abuso deshonesto o cópula, caricias, pérdidas seminales, que integran un acto consentido⁸⁷.

La tipificación de un delito puede ser cambiado por la presencia de semen en el lugar de los hechos encontrado en determinados lugares. Considerando que se encuentran 100 millones de espermatozoides por mililitro de semen, aunque la mancha sea muy pequeña o diluida, aunque sean manchas de limpieza, siempre será posible encontrar espermatozoides en número suficiente para amplificar el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) con técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹.

Existen trabajos, que dan sustento científico a esta clase de estudios y a los conocimientos necesarios para llevarlos a cabo, como los realizados por Mann en 1964 y Stauton en 1969, complementados por Vick en 1987 sobre líquido espermático; los realizados en 1970 por Villanueva en la composición cualitativa y cuantitativa de los elementos bioquímicos, antigénicos, enzimáticos, lípidos y minerales. Además de espermatozoides realizados por Pellissier y Cordoniev, Pérez Villamil y Fuster, Vaechi, Debieux, Muller, Bernardi, Berheim, en el periodo comprendido entre 1960 y 1990³⁴.

La investigación acerca de los componentes del semen, se inicia con trabajos realizados por Kutscher y Wolberg, que en 1935 hacen de manifiesto la elevada concentración de fosfatasa ácida en la próstata. Lundquist en 1945, consideró que el líquido seminal está constituido en gran parte por líquido prostático, propone la determinación de la actividad de la fosfatasa ácida del semen, como test para la identificación de manchas de esperma. Hansen (1946), Rusfelt (1946) y Rasmussen (1945) aplican el test de la fosfatasa ácida al diagnóstico médico legal de las manchas de esperma y Kina (1946) pone a punto una técnica de rutina para ser utilizada en medicina legal⁵¹.

El esperma está constituido de dos elementos distintos: las células o espermatozoides, que proceden de los tubos seminíferos del testículo, y el plasma seminal, que procede del epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas de Cowper⁵⁰.

El estudio realizado para la investigación legal de las manchas de semen, abarca las siguientes pruebas²⁹:

1. Un examen macroscópico, que incluye regiones de hallazgo, aspecto de la mancha con la luz natural o artificial común, aspectos de la mancha con luz ultravioleta¹⁴, palpación de las manchas y cantidad u olor⁵⁸.
2. Un examen microscópico, para buscar de forma directa, o después de la elusión de la mancha, usando métodos de tinción o instrumentales⁵³.
3. Un examen químico que incluye pruebas no específicas, como la reacción de Barberio y la reacción de Florense, y pruebas específicas como la de la fosfatasa ácida, electroforesis, diagnóstico individual y de especie⁸⁹.
4. Además de las técnicas de recuperación de células para la obtención y posterior amplificación de ADN para su estudio y comparación⁸.
5. Técnicas electroforéticas²⁸: Estas tienen la ventaja de ser más confiables que las pruebas cristalográficas, el simple método electroforético puede poner en evidencia la presencia de espermina y colina. El tejido manchado que resultó fluorescente a la luz de Wood se macera en HCl 0.1 N, durante 12 horas. Se centrifuga, manteniendo el tejido fuera del líquido por medio de un hilo que se sujeta al borde del tubo con un papel adhesivo. La espermina aparece como una mancha de color calabaza, que se sitúa a unos 21 cm. de la línea de base. Concluido el desarrollo se seca el papel en estufa a 80 °C por 30 min. La colina aparece como una mancha de color *rojo ciclamen*, que se sitúa aproximadamente a 17 cm. del punto de partida.
6. Otra prueba que permite emitir juicios de certeza, es la presencia de la proteína P30, considerada un marcador específico de semen; es producida por la próstata y secretada al plasma seminal, identificada mediante la técnica de Ouchterlony o inmunoelectroforesis⁴⁸.

La detección del Antígeno Prostático Específico (P30 o PAS) por el método de ELISA es altamente sensible en la identificación de semen (menos de 1 ng/mL), además de ser útil en los casos en que el individuo es azoospermico⁴⁸. En una hoja de papel Schleicher–Schull, se traza una línea a 4 cm. del borde inferior; sobre esta línea se marcan tres puntos, distantes entre sí, en uno se colocará la mancha problema; en el otro un estándar de colina, y en el tercero, un estándar de espermina. Se hace el desarrollo electroforético, usando una disolución reguladora de piridina/ácido acético/agua, de pH 3.9, con un potencial de 350 mV, durante una hora y 50 min.

OBJETIVOS

GENERAL:

Realizar una investigación bibliográfica de los métodos de análisis del semen en casos de violación.

ESPECÍFICOS:

1. Investigar y recopilar la información bibliográfica de las fuentes disponibles, con el fin de que puedan ser utilizados en el laboratorio forense.
2. Analizar, organizar y sistematizar la información recopilada para que sea de utilidad en el campo forense.

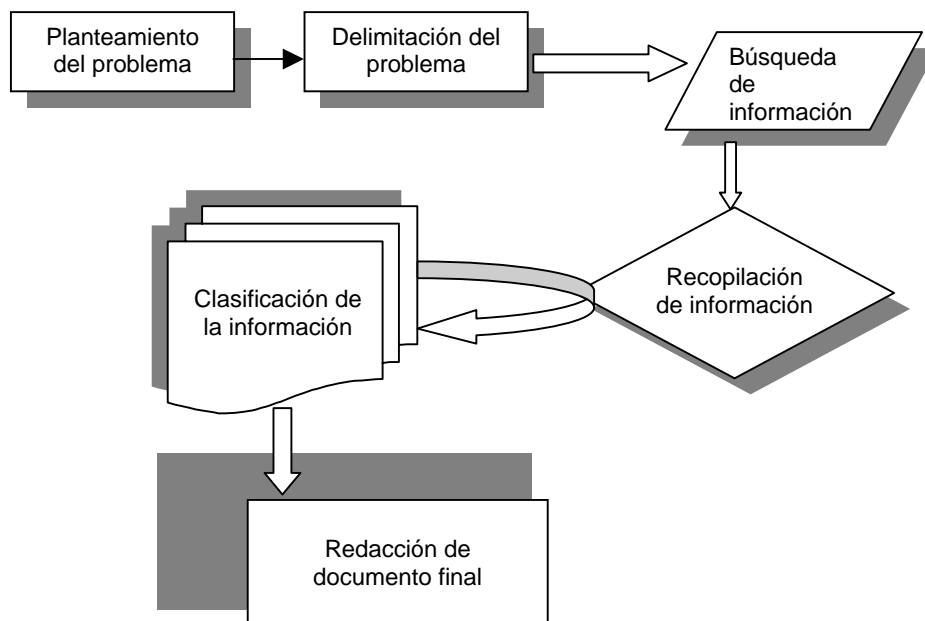
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La falta de información relacionada al tema es de difícil acceso, escasa restringida al público en general y a los estudiosos del tema. Por lo cual es necesario revisar las técnicas y métodos disponibles para el estudio de semen, así como determinar su importancia y su aplicación en el ámbito forense, para apoyar nuevas investigaciones es necesario contar con un acervo científico que sustente las investigaciones en criminalística de una forma científica.

Debido a los avances en el campo de las ciencias de salud, es probable que existan técnicas de estudio de semen más específicas, sensibles, económicas que las actuales, que aún no se utilicen en el campo forense.

MÉTODOS EMPLEADOS

En la primera etapa de la investigación se recopila la información de las fuentes mencionadas. Se acudió a centros especializados en el tema, se entrevistó a investigadores en la materia, y se consultó bases de datos electrónicas. Una vez recopilada, se selecciona y sistematiza la información obtenida. Se procede a analizar mediante cuadros comparativos la información, se captura para el anteproyecto de tesina. Una vez aceptado y registrado el tema, se procedió a la redacción final del documento.



CAPÍTULO II



LA MUESTRA, SU RECOPIACIÓN Y SUS CARACTERÍSTICAS

PROCEDIMIENTO DE RECOPIACIÓN DE LA MUESTRA

La importancia de las manchas de esperma es considerable, porque su presencia en muchos casos tiene significado muy preciso y constituye una prueba acusadora irrefutable ya que entre las huellas que pueden resultar de la comisión de un delito contra la libertad sexual, figuran este tipo de manchas⁶³.

El líquido espermático se puede presentar al investigador en tres formas distintas: como mancha, impregnando un tejido; como fluido, mezclado con otros fluidos corporales, como la secreción vaginal, o como semen o líquido espermático, cuando se obtiene directamente del sujeto para una investigación de esterilidad. En el campo del Derecho Penal está relacionado con los delitos contra la libertad sexual⁵⁹.

El Objetivo de establecer los lineamientos en la recolección⁵², embalaje y envío de muestras e indicios de naturaleza biológica, es con la finalidad de que los peritos relacionados con el manejo de este tipo de elementos, lleven a cabo con eficiencia y eficacia las intervenciones periciales requeridas por la autoridad competente.

a) La importancia de los indicios en el lugar de los hechos

La llegada de las muestras al laboratorio para su procesamiento es el eslabón que viene a unir los dos fragmentos de la cadena de la investigación criminal⁶³. Por una parte, todo el estudio preliminar llevado a cabo en el lugar de los hechos, y por otra el análisis científico en el laboratorio forense.

Todas las acciones del personal relacionado con la investigación van destinadas a un mismo fin: la averiguación del autor o autores del hecho, en este caso por medio de la identificación del violador mediante la identificación indicios

biológicos (del semen). Sin embargo, se tiende a pensar que sólo los últimos pasos, aquellos que van a proporcionar el resultado del análisis genético son los únicos verdaderamente importantes, Esto hace que en muchas ocasiones se pierda un poco de concentración y atención necesaria en las primeras fases de la investigación, y que se piense que con lo avanzado de la técnica hoy por hoy se es capaz de estudiar cualquier indicio, cualesquiera que sean sus condiciones y que lo que se puede hacer mal en las fases preliminares luego será solventado por el buen hacer del personal del laboratorio y por los adelantos científicos⁵⁸.

Nada más lejano de la realidad. Aunque la metodología del ADN nos ofrece grandes posibilidades analíticas sobre los indicios, ese mismo potencial puede jugar en nuestra contra, todo lo cual hace que cada una de las fases sea trascendente para el resultado final del estudio⁵³.

Por elemental que parezca no se debe olvidar nunca que en el laboratorio sólo se estudia lo que se envía, y que el análisis se inicia sobre el indicio que se recibe, no sobre el que se manda⁸, por lo cual si durante el trayecto o el tiempo transcurrido éste se altera, será sobre esa evidencia alterada sobre la que se iniciará el trabajo en el laboratorio. Si el indicio no se recoge (por falta de un adecuado estudio del lugar de los hechos o se recoge mal), por no seguir las normas de forma correcta el resultado final será como si no hubiésemos tenido indicios, afectando por completo el proceso judicial.

El indicio es el soporte físico del análisis¹. La hipótesis básica de la criminalística es que el criminal, por inteligente que sea siempre deja en el lugar donde cometió el ilícito algo que de algún modo nos revela su presencia allí, decía Locard, ya en el siglo pasado, que "... estos testimonios son los únicos que no mienten nunca". Son los que acusan al que no prevé.

La naturaleza tan variada de los indicios exige en rigor la concurrencia de especialistas muy diversos en algunas de las fases: policías, médicos, químicos,

físicos, expertos en balística, en huellas, en fotografía, todo esto incluye conocimientos de las ciencias naturales.

Las evidencias pueden clasificarse en los siguientes grupos, teniendo en cuenta que no son comportamientos típicos y que, por tanto, podremos obtener indicios incluidos en diferentes categorías⁵⁸:

- Según su naturaleza: Orgánicos/no orgánicos.
- Según su tamaño: Macroscópicos/microscópicos.
- Según hayan sido dejados o tomados en el lugar de los hechos: Positivos/negativos.
- SIMONIN los dividía también en relación a si era posible trasladarlos o no al laboratorio de estudio, necesitando realizar una descripción de aquellos que no podían ser transportados. Esto hacía que se dividieran en: Descriptivos/concretos.
- Según su capacidad individualizadora: con características individuales con características de clase.

Cualquier indicio puede resultar clave en un caso determinado, pero sin lugar a dudas en los hechos criminales violentos, son los indicios biológicos los más trascendentes, por su significado y por la información que de ellos se puede obtener a través del análisis del ADN.

b) El lugar de los hechos

Para obtener toda la información que los indicios nos pueden aportar sobre unos hechos criminales y para evitar errores en su manipulación, es básico que éstos

terminen en el laboratorio en condiciones óptimas, lo cual pasa por una correcta investigación del lugar de los hechos⁶⁰.

Es importante tener en mente una serie de características generales:

- El hecho no es actual Necesidad de esquemas y fotografías para perpetuarlo Posibles contaminaciones y pérdidas.
- El indicio es frágil:
 - Puede pasar inadvertido.
 - Se puede perder.
 - Se puede alterar.
- El valor de la prueba indiciaria es relativo; aunque precisamente por esa razón se debe poner el máximo cuidado en la investigación.

El lugar de los hechos⁸⁹ es el espacio físico relacionado con la comisión del delito en alguna de sus fases y en el que debe haber quedado alguna huella o signo del autor o de alguna de las características del hecho.

En concordancia con esta idea, se deriva que el lugar de los hechos no tiene por qué ser único.

Se denomina lugar de los hechos primario al lugar donde se encuentra el cadáver, ya que suele ser donde se inicia la investigación.

Sin embargo puede haber dos o más lugares de hechos, denominados secundarios, y suelen estar en relación a:

- Lugar desde donde se trasladó el cadáver.
- Lugar donde se produjo el ataque.

- Lugar donde falleció la víctima.
- Lugar donde se descubre cualquier indicio.
- Vehículo usado para transportar el cuerpo.
- Ruta de huída.

Los lugares físicos donde haya estado el probable responsable en alguna fase de los hechos o en momentos cercanos a los mismos (anteriores o posteriores) se denominan hábitat⁶³. El hábitat será en la mayoría de las ocasiones parte de los lugares secundarios que no han tenido relación con el crimen, pero en los que podemos encontrar datos o elementos que ayuden a la identificación de la persona o al esclarecimiento de lo ocurrido. Un ejemplo de este último caso podría ser el lugar de trabajo de una persona donde encontraremos un recorte de periódico con la foto de una persona que ha sido asesinada o violada, sin que en dicho lugar haya ocurrido nada relacionado con el hecho criminal.

Cada uno de los lugares debe ser estudiado con la misma disciplina y meticulosidad, recordando que en los espacios físicos debe incluirse la zona circundante, no sólo el lugar donde se encuentran los indicios.

Siguiendo una investigación adecuada en el lugar de los hechos, además se podrán ubicar perfectamente en relación al lugar y así obtener información y deducciones sobre las circunstancias que rodearon al delito.

Por otra parte, se tendrá una documentación gráfica de los indicios que puede evitar cualquier intento de desvirtuación, y datos sobre las condiciones en las que permanecieron y que pudieron afectar su conservación. Del mismo modo se dispondrá de la identificación de las personas que intervinieron por si fuera necesario aclarar algún problema de contaminación⁵³.

El análisis del semen no sólo se realizará con las garantías suficientes⁶⁷, sino que además muchas de las cuestiones que surgen en el laboratorio, lejos del lugar

de los hechos, que conviene aclarar para poder interpretar algunos de los resultados que en principio no tienen mucha lógica o justificación podrán ser resueltas y posibilitar a su vez nuevos enfoques en el análisis de los múltiples indicios que se suelen remitir al laboratorio. La comunicación entre el laboratorio y el criminalista de campo siempre debe existir y ser fluida⁵⁹.

c) Aislamiento y evaluación de los riesgos de contaminación

El semen ha de ser buscado y recogido en el lugar de los hechos, por lo que se debe exigir una perfecta detección, identificación y aislamiento de los mismos para evitar la contaminación de índole biológico o químico que pudiere producirse⁶³.

Por lo tanto, se deduce que existen dos tipos fundamentales o básicos de contaminación que, pueden afectar a las muestras e indicios biológicos criminales: la contaminación química y la biológica.

Se denomina contaminación química a la presencia de productos de origen bioquímico o químico (tintes, colorantes, pinturas, esmaltes, carburantes, aceites,...) que van a dificultar los procesos de análisis en el laboratorio, bien sea durante la extracción, cuantificación, restricción o amplificación del ADN⁴⁹.

Este tipo de contaminación es muchas veces inevitable, ya que suele encontrarse en el sustrato en donde cae la mancha (tierra, pantalón vaquero,...) y puede ser penosa para el laboratorio, pues impide que las Investigaciones lleguen a buen puerto. Cada proceso de análisis de los mencionados tiene variaciones técnicas que se pueden aplicar cuando se sospecha de una contaminación química, con lo que en gran número de los casos se alcanza una solución satisfactoria, pese a que alarga enormemente (semanas) el proceso de análisis.

Pero existe también la llamada contaminación biológica que es propia de indicios humanos, al consistir en la mezcla de ADN que no pertenece al indicio con ADN del indicio³⁵.

Y es que las técnicas empleadas en la actualidad tienen gran efectividad para obtener información de indicios biológicos mínimos, invisibles muchos de ellos para el ojo humano. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{81, 65} o la secuenciación de ADN mitocondrial por técnicas de secuenciación en ciclos (cycle sequencing) son capaces de amplificar una sola célula que contenga ADN de una persona aunque esté mezclada con miles de células con ADN de otra persona. Esta circunstancia, denominada genéricamente sensibilidad es un grave peligro en la investigación criminal, ya que una mezcla indeseada de muestras puede originar graves problemas. Por ello, es necesario tomar desde el comienzo de la investigación, las máximas precauciones posibles, hasta llegar a extremos que bien pueden ser calificados por personas ignorantes de esta temática, de ridículos o exagerados.

La contaminación biológica de los indicios criminales puede ser de tres tipos: anterior o previa, coetánea o paralela y posterior, que a su vez puede ser accidental, negligente o criminal, según la relación que guarden con el hecho criminal que motiva la investigación. Todas ellas son peligrosas, en tanto cuanto pueden tergiversar o inutilizar los resultados, aunque la más peligrosa de todas es la posterior, ya que no ofrece ningún dato útil a la investigación y es totalmente evitable⁵⁹.

La contaminación se descubre normalmente en el laboratorio, cuando al analizar los indicios se detecta ADN de más de una persona. En este momento el investigador debe plantearse cuál es el origen de la contaminación, para poder adoptar los protocolos analíticos oportunos y poder valorar correctamente los resultados. Por ello, el personal de los laboratorios debe tener la garantía de que la contaminación no se ha producido criminal o negligentemente, con posterioridad al delito investigado, pues es una dificultad evitable que puede invalidar la prueba ya en el laboratorio (por existir dificultades técnicas al analizar las muestras) o servir de

base para que alguna de las partes presentes en el proceso (defensa, acusación particular, Ministerio, Fiscal) puedan pedir, en buena lógica, la anulación de la prueba (al no estar los resultados claros), o reclamen la coautoría de los hechos por parte de otras personas desconocidas y no procesadas².

Contaminación anterior o previa. Se debe a la presencia de material biológico con, ADN en el lugar donde luego van a aparecer los indicios, y se caracteriza por ser inevitable (al estar presente antes de que se depositen los indicios criminales), por ser parcialmente valorable (al poder descubrirse que es accidental, por ejemplo en sustratos muy contaminados) y por ser potencialmente útil (el producto contaminante puede ser del criminal, de algún coautor o de una víctima previa)³².

Evidentemente, si en un caso determinado aparece una pequeña mancha de sangre (evidencia) en la perilla de una puerta, en un fragmento de papel o en un cenicero, en el momento de recogerla es inevitable que el investigador pueda arrastrar ADN de otras personas que, siendo ajenas al hecho criminal, dejaron el mismo depositado al abrir la puerta, al tirar un papel o ni manejar el cenicero.

Existen métodos de recolección de muestras que tratan de evitar la inclusión de ADN contaminante al recoger el indicio criminal⁵⁴. Con este fin, por ejemplo, se puede tomar parte de una mancha de sangre o de semen por medio de un hisopo de algodón estéril y solución salina estéril, en vez de recortar o raspar la mancha completa del sustrato. Hay muchas variantes de este tipo de "trucos" técnicos, que cada laboratorio utiliza cuando lo estima procedente y de acuerdo con sus experiencias.

Paralelamente, en los laboratorios hay que realizar controles de despistaje de contaminación o controles negativos del indicio, consistentes en la amplificación del material obtenido de trozos de sustrato que tiene el indicio. Por ejemplo, si encontramos una mancha de sangre en un zapato de cuero, no sólo hemos de intentar extraer el ADN del trozo de cuero que tiene la sangre, sino que hemos de tomar Lino o

más trozos de cuero de otras zonas del zapato y tratarlas como si tuvieran ADN, sometiéndolos a procesos de extracción. Si en un trozo de cuero que no estaba manchado (control) aparece ADN, hemos de deducir que existe una contaminación, que habrá de valorar adecuadamente de acuerdo a las circunstancias del caso.

Este tipo de contaminación puede ser, en ciertos casos y circunstancias, de utilidad, ya que puede ofrecernos pistas sobre diversas circunstancias relacionadas con un sustrato a veces sustratos que por sus características deberían de estar totalmente limpios, aparecen muy contaminados con ADN de múltiples orígenes, o viceversa.

En otras ocasiones, cuando se intenta confirmar que un indicio procede de una persona, aparecen también datos genéticos de otra: por ejemplo, en el caso en que aparezca un pañuelo manchado con sangre cerca del cadáver de una persona que murió por un disparo de arma de fuego, la idea inicial de los investigadores puede ser confirmar que la sangre es del fallecido, pero también podemos encontrarnos con restos de ADN del homicida, si el pañuelo era de su pertenencia, pudiendo servir este dato para incriminarlo posteriormente. Evidentemente, cada caso es un "mundo" diferente, pero en los que todas las posibilidades hay que tenerlas en cuenta.

En general, las contaminaciones previas que más utilidad tienen por la información que pueden ofrecer, son propias de los casos en que el arma homicida era una pertenencia personal del autor del crimen (arma blanca o de fuego, correas o cinturones, lazos o pañuelos en casos de asfixias,...)⁴³.

Contaminación coetánea o paralela. El ADN de un indicio se mezcla con ADN de otro origen en el momento de los hechos, y al igual que la contaminación anterior o previa se caracteriza por ser inevitable, valorable y útil³⁴.

Se diferencia, en la práctica, de la contaminación anterior en que la paralela es valorable y útil, ya que los indicios que se mezclan son de personas envueltas en los hechos criminales mientras que en la contaminación anterior, los indicios pueden no tener relación con los hechos violentos, como de hecho así ocurre en la mayoría de esos supuestos.

Es propia de hechos especialmente violentos (violación), en los que tanto la víctima como el agresor depositan material biológico con ADN de un mismo sustrato al mismo tiempo⁶. Hay que remitirse en estos casos al ejemplo más típico: dos personas heridas y perdiendo sangre que se enzarcan en una lucha en muchos lugares aparecerá sangre de los dos mezclada. También se pueden dar mezclas muy variadas de diversos fluidos, como son el semen, la saliva, orina (en casos más excepcionales, pueden servir de origen del ADN los restos de piel del agresor en las uñas de la víctima o viceversa).

También es propio de criminales desorganizados o con alto componente de stress: el dejar huellas o rastros evidentes no es propio de criminales con experiencia, ni de crímenes bien planeados o ejecutados, siendo en estos casos factor común el "stress" o tensión nerviosa y/o emocional en que se encuentra el autor (por haber sido parcialmente descubierto, por tener que abandonar el lugar de los hechos de prisa, por herirse con posterioridad, etc.)⁷.

Sin embargo, los casos paradigmáticos de contaminación paralela o concomitante son los supuestos de violación (vaginal, anal y oral) en los que el semen del criminal se mezcla con células y fluidos de las diversas estructuras anatómicas de la víctima. En estos casos, la contaminación es conocida a priori por el investigador, y puede ser manejada adecuadamente tomando controles de la víctima: cuando aparezcan dos ADN diferentes, uno será conocido por ser de la víctima, siendo el restante del violador³⁴.

La contaminación paralela es especialmente valorable cuando la víctima sobrevive y es capaz de dar una explicación de los hechos, lo que permitirá centrar la investigación en indicios especialmente útiles y posteriormente facilitará los análisis en el laboratorio⁶³.

En los casos de violación y en todos aquellos supuestos en los que uno de los indicios sea semen mezclado con cualquier otra muestra biológica, hemos de recordar por su importancia que existen técnicas de extracción diferencial que permiten aislar el ADN contenido en los espermatozoides y separarlos de otras células como las del epitelio vaginal o de la mucosa oral⁵³.

Contaminación posterior. Se debe al depósito de ADN de diversos orígenes en los indicios y sustratos criminales con posterioridad al momento de los hechos. Puede tener origen accidental, negligente (culposo) o criminal (intencional)³⁴.

Se caracteriza por ser notablemente evitable, parcialmente valorable (sólo en los casos en que se pueda demostrar que la contaminación es posterior, identificando al donante del material biológico) e inútil (al no aportar datos de interés a la investigación).

Contaminación posterior accidental. En el periodo de tiempo transcurrido entre la ejecución de un hecho criminal y el momento en que se encuentran y aíslan los indicios (que puede oscilar desde pocos minutos hasta años), es obvio que se pueden depositar otros materiales biológicos que contengan un ADN que normalmente no va estar relacionado con los hechos⁵¹.

Vano intento, condenado ya al fracaso, sería el tratar de describir, siquiera esquematizar, cuáles son las posibles circunstancias y combinaciones que puedan darse. Básicamente deben distinguirse los indicios que aparecen a la intemperie, (susceptibles de ser afectados por fenómenos meteorológicos y de entrar en

contacto con animales, insectos, personas y objetos contaminados) y que son fácilmente contaminables, de aquellos que aparecen aislados (enterrados en habitaciones o espacios cerrados, etc.) en los que la contaminación posterior es más difícil, pero no imposible ⁶¹.

En general cualquier indicio puede contaminarse a posteriori con material que contenga ADN Y que sea arrastrado por animales salvajes y domésticos, insectos (especialmente moscas y mosquitos), personas ajenas a la investigación que los tocan desconociendo la importancia que pueden tener, o incluso tratando de ayudar a los investigadores (personas que encuentran y recogen cualquier indicio para llevarlo a la policía) o por fenómenos naturales y meteorológicos (viento que arrastra pelos, lluvia que mezcla muestras diferentes) ⁵².

Con una valoración siempre prudente de los hallazgos, la contaminación posterior nos puede dar datos de la situación en que ha permanecido el indicio, incluso sobre cambios de Ubicación (accidentales o intencionados) que haya podido sufrir hasta el momento en que fue encontrado.

Contaminación posterior negligente. Se debe a la culpa –por desconocimiento o falta de celo profesional– de aquellas personas que manejan los indicios y tienen la obligación de preservarlos perfectamente ³⁴.

Para evitarla procede aislar el lugar de los hechos lo más rápido posible y con los medios que inicialmente haya al alcance, en principio, y hasta poder valorar claramente la situación, más vale “aislar por exceso” que por defecto. Estos datos deberían de ser conocidos por todos los agentes de las fuerzas del orden público, cuerpos superiores de investigación, bomberos, fuerzas de protección civil, cruz roja, etc., en resumen, todas aquellas personas que pueden verse implicadas en la investigación y resolución de hechos violentos.

Es típico ver en las escenas criminales a múltiples curiosos, a pocos pasos o incluso dentro de la zona o zonas donde puede haber indicios, muchos de ellos fumando y arrojando colillas en las cercanías. Es bastante frecuente observar cómo los investigadores toman los indicios sin portar guantes (y si últimamente se usan los guantes no es por ser conscientes de la posibilidad de contaminar, sino por miedo a enfermedades infecto-contagiosas como el SIDA). Otras veces se ve a testigos explicando a los investigadores cómo ocurrieron los hechos, para lo cual los mismos repiten lo que vieron sobre el mismo escenario, andando y tocando pruebas que pueden ser importantes²⁸.

El lugar de los hechos suele ser punto de reunión de todas las personas implicadas en las diversas fases de la investigación, convirtiéndose muchas veces en un ambiente sobrecargado donde se habla continuamente, se fuma, se bebe y hasta se come, siendo todas estas fuentes de contaminación evitables⁶³.

El acceso debe estar inicialmente restringido a todos los investigadores y autoridades hasta que no hayan evaluado y tomado correctamente las muestras biológicas que pueden tener ADN. Con posterioridad siempre habrá tiempo para que el resto de los equipos actúen y cumplan con su misión³¹.

Contaminación posterior criminal. Pese a darse en muy pocos casos y siempre en extrañas circunstancias, ya se han descrito casos en los Estados Unidos. Se produce cuando alguna persona tiene acceso a los indicios, bien en el lugar de los hechos, bien (más raro) durante su transporte o en los lugares donde se almacenan, para proceder a cambiarlos, tergiversarlos o destruirlos²⁹.

Por ellos ha de destacarse en este lugar la importancia que tiene la custodia de los indicios de este tipo y la necesidad de mantener la denominada cadena de custodia, dejando constancia de qué personas han tenido acceso a los indicios y

quiénes han sido los responsables de su transporte y almacenamiento desde el momento de la recogida hasta que termina su análisis en el laboratorio⁵⁹.

d) Consideraciones preliminares para la recolección de muestras e indicios de naturaleza biológica

Las enormes posibilidades de la tecnología del ADN no deben relajar a los peritos a la hora de realizar la investigación en el lugar de los hechos y pensar que la solución de la investigación dependerá del Laboratorio en cuestión al que se remitan los indicios hallados, ya que no sólo se trata de buscar una determinada evidencia, sino de hacerlo correctamente, de lo contrario podría ser que pierda su actividad biológica o que la prueba quede invalidada por un defecto en la investigación preliminar. Por elemental que parezca, no se debe olvidar nunca que en los laboratorios sólo se estudia aquello que se remite, y que el análisis se inicia sobre el indicio, en las condiciones que llega, no en las que se manda; de ahí la enorme importancia de indicio en el lugar de los hechos⁵⁹.

Cuando el Perito llega al lugar donde se cometió el delito, debe estar preparado para manejar y recoger el indicio. Debe procurar hacer acto de presencia a la mayor brevedad posible, ya que conforme pasan las horas la evidencia (indicios) se destruye, altera o en el peor de los casos desaparece.

Los indicios, es decir el material sensible significativo relacionado con los hechos que se investigan, constituyen el objeto formal de estudio de la criminalística. Los indicios pueden ser encontrados tanto en el lugar de los hechos, en el cuerpo de la víctima o del victimario, como de las áreas relacionadas, ya sean próximas o distantes. Su manejo inadecuado conduce a su contaminación deterioro o destrucción, siendo éstas las causas más frecuentes que impiden su ulterior examen en el laboratorio.

La investigación pericial consta de tres etapas⁵²:

1. Búsqueda en el lugar de los hechos, sobre víctimas o los implicados.
2. Recolección y envío al laboratorio.
3. Exámenes analíticos y su interpretación.

Las dos primeras son fundamentales en relación a los vestigios orgánicos, toda vez que si se quiere reconstruir con cierta claridad un hecho delictuoso o identificar al infractor, es necesario, en primer lugar preservar y conservar el lugar de los hechos, precepto fundamental en la investigación científica de los mismos, de ahí que se debe saber la forma de identificarlos, recogerlos y enviarlos.

Tras ser reconocido, todo indicio debe ser adecuadamente documentado, levantado, recolectado, empaquetado y preservado⁸:

- a) Si no es adecuadamente documentado su origen puede ser cuestionado.
- b) Si no es recolectado correctamente, su actividad biológica se puede perder.
- c) Si es incorrectamente empaquetado puede haber contaminación cruzada.
- d) Si no es adecuadamente preservado, su degradación y descomposición puede afectar el estudio.

En la documentación, se debe apuntar perfectamente cómo y dónde se encontraba el indicio, describiéndolo y relacionándolo con otros objetos o indicios, todo lo cual debe hacerse antes de moverlo. La toma de fotografías y esquemas es de gran utilidad.

Durante la recolección, conservación y envío, debe evitarse la contaminación, ya que cualquier material orgánico procedente de los manipuladores puede imposibilitar el estudio. En este sentido deben seguirse las siguientes normas generales³⁴:

- Procurar las máximas condiciones de esterilidad, usando guantes, patucos si se entra en el lugar de los hechos e instrumentos esterilizados o limpios.
- Volver a limpiar y exponer al fuego por tres minutos como mínimo si es posible el instrumento utilizado, o utilizar un nuevo instrumento para recoger un indicio diferente. En cada caso en que se estén utilizando guantes, cambiarlos si éstos tienen contacto con los indicios.
- Usar diferentes recipientes para cada indicio, aunque hayan sido recolectados en lugares muy próximos o estuviesen juntos.
- Etiquetar perfectamente cada uno de los recipientes haciendo referencia al menos la fecha, hora, identificación de la víctima, localización del indicio, tipo de indicio y número del mismo, nombre de la persona que recolecta y referencia legal del caso.
- Enviar lo más rápido posible al laboratorio, asegurando que las muestras que lo necesiten lo hagan en las condiciones adecuadas.
- Es fundamental y básico tomar muestras testigo de la víctima o probable responsable, así como del lugar de los hechos (testigo negativo).
- Tomar la filiación de todas las personas que han intervenido o colaborado en la recolección de las muestras por si se produce algún problema de contaminación cruzada.

Estas normas generales se complementarán con aquellas que son específicas a determinadas muestras biológicas y a su forma de presentación.

e) Recolección y preservación de los diferentes tipos de muestras biológicas

Debido a que muestras biológicas extremadamente pequeñas pueden ser usadas como evidencias, se debe poner especial atención en la contaminación cuando se identifiquen, colecten y preserven las muestras para estudios de ADN⁶². Las muestras pueden estar contaminadas cuando el ADN de otras fuentes se mezcla con el ADN relevante relacionado con el caso. Esto puede suceder cuando alguien estornuda o tose sobre la evidencia o toca su boca, nariz u otras partes de la cara y después toca el área que puede contener el ADN involucrado con el ilícito. Debido a que la tecnología denominada PCR (reacción en cadena de la polimerasa)⁸¹ replica o copia el ADN en la muestra biológica, la introducción de contaminantes de otras fuentes puede resultar muy problemática. Para evitar este escenario, se deben tomar precauciones especiales a fin de prevenir los contaminantes que en cualquier circunstancia son indeseables. Si se recolecta una muestra biológica para estudios de ADN, el proceso de PCR⁵⁵ copiará cualquier ADN presente en la muestra, no será posible distinguir entre el ADN del probable responsable y el ADN de otra fuente.

Una vez que el lugar de los hechos ha sido totalmente documentado y se ha localizado la evidencia, se podrá empezar el proceso de colección. El proceso de colección usualmente inicia con la evidencia más frágil o más fácil de perder⁷¹. Se debe tener una consideración especial con los objetos o evidencias que requieren ser movidos.

Las evidencias biológicas son transferidas por vía directa o secundaria⁵⁴, estas quedan sobre superficies por absorción o adherencia. En general, las muestras líquidas son absorbidas dentro de las superficies y las evidencias sólidas se adhieren a las superficies. El método de recolección depende ampliamente del estado líquido o sólido y de las condiciones de la evidencia.

EL SEMEN Y SUS CARACTERÍSTICAS ÚTILES PARA SU ANÁLISIS EN EL LABORATORIO

El semen, casi siempre es un testigo mudo de las agresiones sexuales, es decir, de los delitos que atentan contra la libertad sexual²¹. El espermatozoide se puede encontrar como mancha o fluido sobre las ropas, sobre el propio sospechoso o sobre la víctima, aportando así una prueba muy significativa³⁵.

El líquido espermático está constituido por espermatozoides, células propias del epitelio uretral y plasma seminal. Los espermatozoides constan de tres partes: cabeza, que contiene el núcleo (ADN), porción intermedia y cola. Su color y aspecto es lechoso, algo opalescente. La opalescencia es proporcional a la concentración de espermatozoides. Coagula inmediatamente después de la eyaculación⁶³.

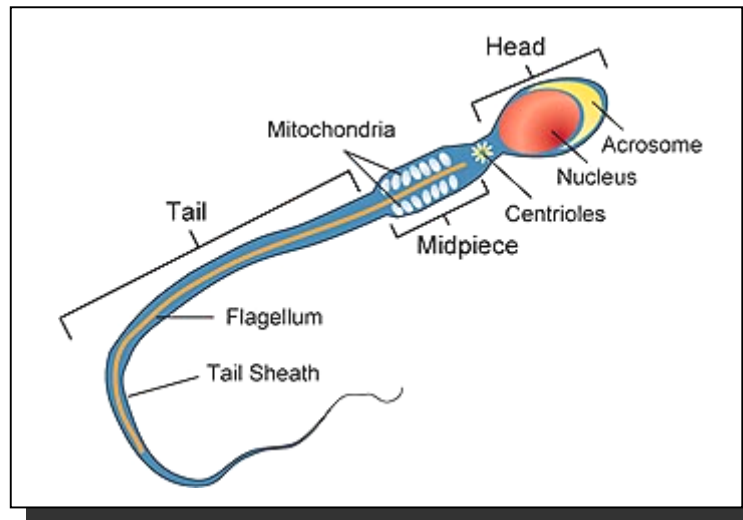


FIGURA 1. Morfología de un espermatozoide.

En los tejidos absorbentes forma unas manchas de color gris-amarillo, bien delineadas y de consistencia almidonada. Si la mancha es reciente, tiene un olor típico. En las telas blancas las manchas se perciben mal y deben examinarse por transparencia. Cuando son de color han de examinarse a trasluz y por contacto para determinar la consistencia almidonada. Cuando las telas son impermeables aparecen

como pinceladas de barniz. Sobre los pelos, constituyen un magma grisáceo que los aglutina y sobre objetos sólidos aparecen como costras brillantes⁶³.

Manchas seminales y semen encontrados en el lugar de los hechos

- Documentar los indicios del crimen por notas, fotografías o videocasete del semen.
- Usar un hisopo estéril desechable y levantar la mancha humedeciendo el hisopo con solución salina estéril con movimientos rotatorios⁷⁷.
- Etiquetar la caja portahisopos (swab box) con el número de caso y artículo, fecha, hora, lugar, y nombre del colector.
- Mantener la muestra refrigerada y enviarla al laboratorio tan pronto como sea posible.
- Alternativamente, el líquido seminal puede ser absorbido con una tela de algodón que posteriormente se seca al aire libre, se empaqueta, sella y etiqueta adecuadamente.
- Tomar un control negativo.

Manchas seminales sobre objetos movibles

- Las manchas seminales en pantaletas, ropa, sábanas, almohada y otros objetos que se puedan mover se deben coleccionar como tales.
- Si un artículo tiene una mancha húmeda, la mancha se debe secar al aire libre y después coleccionar el objeto.
- Cada objeto debe ser empaquetado individualmente en un contenedor de papel limpio.
- Cada objeto debe ser etiquetado y sellado adecuadamente.
- Los objetos empaquetados se deben refrigerar si es posible y enviarlos al laboratorio tan pronto como sea posible.

Manchas de semen en objetos grandes que se pueden cortar

- Ejemplos de objetos grandes que pueden ser cortados y que puedan tener manchas seminales en ellos, son: las alfombras, sábanas y la tapicería.
- Documentar la evidencia como se describió anteriormente.
- Usar unas tijeras limpias para cortar el área que contenga la mancha. Cortar otra área que no contenga la mancha, como control negativo.
- Poner cada corte separadamente dentro de piezas de papel limpio.
- Hacer un envoltorio seguro para la evidencia, para evitar cualquier contaminación.
- Colocar el envoltorio dentro de un contenedor adecuado de papel, sellar el contenedor y etiquetarlo.

Manchas seminales sobre superficies no absorbentes y fijas

- Ejemplos de estas superficies son: pisos, mostradores y superficies metálicas.
- Documentar la evidencia como se describió anteriormente.
- Usar un escalpelo limpio para raspar manchas de semen, depositarlo en sobre de papel limpio perfectamente rotulado.
- Raspar una pequeña área en la que no se observe mancha de semen, como control negativo.
- Esterilizar el escalpelo después de cada uso, para evitar la contaminación.
- Colocar los hisopos en una caja portahisopos (swab box).

Muestras de semen en la víctima⁸⁵

- Las víctimas de ataque sexual siempre deben ser examinadas médicamente por personal calificado y autorizado.
- El equipo estándar que se debe usar en una violación debe permitir recolectar muestras vaginales, orales y anales según se requiera, así como de zona púbica

e inguinal si la víctima refiere rastro de semen en estas zonas. Este tipo de muestras biológicas son recolectadas con hisopos estériles, desechables y no humedecidos si se recolectan muestras de mucosas, o ligeramente humedecidos con solución salina isotónica estéril si se recolectan muestras de la piel.

- Cada indicio se debe empacar (portahisopos o swab box), sellar y etiquetar adecuadamente.
- El indicio se debe enviar al laboratorio tan pronto como sea posible.

Otras Manchas

- Las manchas de orina, saliva, semen u otras manchas de fluidos corporales se colectan como tales, o se extraen del sustrato⁵⁴ cortando el área o utilizando hisopos estériles, previamente humedecidos, o bien con papel FTA especial para el levantamiento de saliva.
- Colocar cada muestra en un contenedor de papel limpio. La muestra se debe coleccionar dentro de un envoltorio de papel limpio o en una caja portahisopo (swab box). El envoltorio posteriormente se debe colocar dentro de otro contenedor de papel.
- El contenedor debe ser sellado y etiquetado adecuadamente.
- Las muestras se deben transportar al laboratorio tan pronto como sea posible.

MUESTRAS ADICIONALES QUE COMPLEMENTAN EL ANÁLISIS DE SEMEN

En los casos más frecuentemente atendidos por la especialidad de Genética Forense recomienda coleccionar las siguientes muestras; semen en exudado vaginal, anal, oral, preservativos y papel higiénico; saliva en piel (zonas erógenas), latas de refresco o cerveza; pelo en superficie corporal y ropas, tejido en lecho ungual, sangre de probable responsable y de denunciante o víctima⁴⁰.

Y el material usado sería; Hisopos estériles, solución salina estéril en frasco gotero de plástico, portahisopos, guantes, cubrebocas, bata, peine desechable, pinzas, encendedor o lámpara de alcohol, cajas de cartón, pluma y plumín, sobres de papel, cortauñas, palillos, alcohol, bolsas de papel, tubos vacutainer, adaptador para tubos vacutainer, agujas estériles para sistema vacutainer, ligadura, torundas, alcohol.

Las enormes posibilidades de la tecnología del ADN no deben relajarnos a la hora de realizar la investigación en el lugar de los hechos y pensar que la solución de la investigación dependerá del laboratorio en cuestión al que se remitan los indicios hallados, ya que no sólo se trata de buscar una determinada evidencia, sino de hacerlo correctamente, de lo contrario podría ser que pierda su actividad biológica o que la prueba quede invalidada por un defecto en la investigación preliminar.

La destrucción o degradación de las muestras es resultado de la acción de enzimas que azarosamente degradan el ADN empezando por el final de la molécula (exonucleasas) o produciendo un rompimiento doble de las hebras (endonucleasas). Estas enzimas están presentes en la célula o en bacterias y empiezan su acción después de que la célula muere⁷².

Tal vez, el procedimiento más rápido y sencillo para preservar muestras es congelándolas. Este procedimiento se aplica a muchas muestras de material biológico debido a que éste detiene el crecimiento de bacterias y la actividad de las enzimas que dividen o rompen al ADN. La mejor temperatura para almacenar material biológico por un periodo ilimitado es a -70°C o en nitrógeno líquido. Por un período de pocas semanas éste puede ser almacenado a -20°C . Se recomienda almacenarlo en hielo, solamente, por pocas horas y no más de pocos días. Una vez que una muestra ha sido congelada esta no se debe descongelar y congelar repetidas veces, ya que esto favorece el rompimiento celular y facilita la degradación del ADN⁸.

Otra manera de preservar muestras es secar al aire las muestras líquidas sobre papel filtro⁶² o sobre tela de algodón limpia. Artículos, tales, como sangre o semen se pueden almacenar por muchos años como manchas secas en sobres sellados (para protegerlos de la humedad) y almacenarlos a 4 o -20°C ⁸.

No se recomienda preservar los tejidos en formaldehído u otros químicos similares, ya que el ADN se degrada después de un almacenamiento prolongado. Una muestra de tejido que haya sido fijada se debe enjuagar con solución salina y después mantenerla refrigerada o congelada hasta que esté lista para procesarla⁸.

Una ventaja del ADN sobre las proteínas es que el ADN es más resistente a la degradación que las proteínas a causa de las condiciones ambientales. Los efectos más significativos del ambiente sobre el ADN son los rompimientos hidrolíticos y oxidativos⁸.

MUESTRAS DE MATERIAL ADICIONAL REQUERIDOS PARA COMPLEMENTAR EL ANÁLISIS DEL SEMEN

Es importante tener presente que, en el desarrollo de los peritajes relacionados con la violación, pueden lograrse, distintos tipos de muestras, que podrá analizar en forma inmediata y directa el propio perito o enviarse al laboratorio criminalístico, donde serán estudiadas. Este es un punto de interés especial en el peritaje por el valor que representa⁷⁴.

Debido a la gran diversidad de muestras significativas a tomar en un caso de violación es importante dar a cada una de las muestras el seguimiento científico adecuado para saber que es lo que se desea demostrar y en cada caso conseguir que ésta se convierta en un indicio sabiendo en cada uno de estos casos la importancia de ser positivas.

Las muestras por tomar son las siguientes:

1. **Material de aspiración vaginal.** Permiten determinar: la existencia o no de espermatozoides, el tipo de fosfatasa –ácida o alcalina– y el tipo de grupo sanguíneo. Los espermatozoides son móviles hasta 12 horas después de la eyaculación en vagina, y hasta durante tres o cuatro días pueden permanecer no móviles en dicha cavidad⁴³.

Las aglutininas ABO, se secretan por sangre, saliva, sudor y esperma. En la tipificación del esperma, al igual que la realizada con sangre, permite la segura exclusión de eventuales acusados del ilícito. La fosfatasa ácida del semen se ha encontrado dos semanas después de la cópula, en cadáveres y se encuentran en muestras secas durante tres años, como lo demostró Schiff⁵³. Esta enzima puede encontrarse en la eyaculación azoospermica.

2. **Material obtenido de zona bucal.** Esta muestra se tomará en los casos en que la supuesta víctima refiere haber recibido una eyaculación en la boca. Se deben tomar muestras por raspadura detrás de los incisivos centrales superiores, que es donde se han encontrado en mayor cantidad de espermatozoides intactos²⁰.
3. **Material obtenido del conducto anorrectal.** La existencia de esperma en la zona anorrectal puede evidenciarse en los reconocimientos precoces y se realiza por aspiración directa del material existente, o mediante la práctica de un enema de limpieza rectal, investigando en el líquido obtenido.
4. **Muestra de sangre.** En todos los casos, se debe tomar una muestra de sangre de la supuesta víctima, lo cual servirá para tipificar la misma y para determinar la eventual existencia de alcohol, anestésicos o psicodrogas. Por otra parte, servirá también para determinar la subunidad beta de Gonadotropina Coriónica Humana HCG. Además, deberá realizarse rutinariamente VDRL, tomando para ello una muestra aparte de sangre.

5. **Muestra de orina.** Se debe tomar en forma sistemática una con la finalidad de realizar un diagnóstico de estado anterior de embarazo. Clásicamente, se realiza el orthotest, pero su positividad es tardía, además de haber falsos positivos y negativos.

NOTA: *Se aconseja como de suma utilidad determinar en forma específica, directa y cuantitativa la existencia de gonadotropina coriónica humana (GCH) en suero de plasma, en su subunidad beta. La particularidad de esta determinación radica en que a los siete días hay una concentración de 10 a 30 mUI/ml de subunidad beta de HCG; a la semana, de 30 a 300 mUI/ml; a la tercera semana; de 300 a 3 000 mUI/ml; a la cuarta semana, de 3 000 a 15 000 mUI/ml. Si contamos con este medio diagnóstico preciso, completamente distinto del orthotest, podremos saber si una mujer se refiere ser víctima de violación realiza una falsa denuncia, habida cuenta de que se encuentra embarazada y quiere lograr enmascarar tal situación, además de buscar autorización judicial para la práctica de un aborto (artículo 86 del Código Penal Argentino)⁸⁹; o bien, tratarse de una violación, y el embarazo existir previamente, con lo cual el delincuente no será el responsable de la paternidad.*

6. **Recolección de pelos.** Estos pueden ser arrancados, cortados o caídos, tanto de la víctima presunta como ajenos a la misma. En dichos pelos se buscarán en el pubis o se tomarán de las ropas, en caso de existir. Los pelos nos permiten identificación, como la sangre, pero sirven muy bien para su comparación, en caso de ubicarse el presunto autor del ilícito.
7. **Muestra de flujo vaginal.** Se debe tomar una muestra de flujo vaginal, en caso de existir, para diagnosticar una eventual contaminación venérea. Sería muy buena práctica realizar rutinariamente cultivos de material endocervical en busca de *Neisseria gonorrhoeae*.

8. **Mordeduras humanas.** En algunas ocasiones, la supuesta víctima evidencia que, como bien explica Bonnet, se diferencian las mordeduras provocadas por animales. El examen comparativo de la herida con la dentadura que la produjo puede señalar al autor o descartar a un sospechoso (odontología forense)⁷².

9. **Raspado de las uñas.** En casos de resistencia activa de la víctima, debajo del borde libre de las uñas pueden encontrarse restos de piel del agresor o agresores en cuyo caso se tomará una muestra de ello y se enviará al laboratorio para su diagnóstico. Esto constituirá una prueba más de la real existencia de la agresión denunciada.

10. **Ropas de la víctima.** Deberán enviarse al laboratorio las ropas de la presunta víctima, y sobre las mismas se practicará una reacción sobre posibles manchas de sangre, de esperma, etc. Cabe recordar que es útil examinar las prendas de vestir con luz de Wood, ya que muestra fluorescencia.

EFFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE LA INTEGRIDAD DEL ADN

Un aspecto importante en las pruebas de identificación de muestras forenses es entender la manera en la cual la exposición al ambiente puede afectar los resultados de la prueba. Desde que las propiedades físicas o químicas del ADN están bien entendidas es posible predecir que una exposición prolongada a los rayos del sol, una temperatura cálida y una alta humedad provocarán la degradación del ADN. Incluso, aún sin la presencia de factores externos, las endonucleasas liberadas sobre la célula muerta pueden causar la degradación del ADN. Sin embargo, debido a que estos rompimientos ocurren en sitios cercanos y al azar, la probabilidad de generar fragmentos de ADN de un tamaño particular por una endonucleasa de restricción, dependerá de que tan grande fue la degradación de ADN y del tamaño de los fragmentos de ADN a ser detectados. Los fragmentos polimórficos largos de ADN son más probables de convertirse en un blanco de rompimiento al azar. Una

observación común hecha en muestras de ADN degradado es que los alelos más largos desaparecen mientras que los más pequeños permanecen. Más aún cuando se examinan los polimorfismos de ADN es importante analizar cada locus individualmente. Esto facilitará el análisis de los resultados y los cálculos estadísticos⁸.

En los estudios en los que se han utilizado manchas de sangre y semen muestran que el ADN que se puede utilizar para el análisis de “polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción” (RFLP) han sido recuperadas después de muchos años³². Para el análisis RFLP el ADN es cortado en piezas y así esta secuencia de bases específica crea una serie de fragmentos de ADN, los cuales serán peculiares para esa muestra de ADN. Esto se hace usando una clase de endonucleasas conocida como endonucleasas de restricción. Estas enzimas localizan pequeñas y definidas secuencias de bases (usualmente cuatro o cinco) y cortan el ADN en ese punto. La enzima escogida reconoce una palabra, digamos (and) y en cada punto donde esté (and) el texto será roto. Esto facilita entender las diferentes longitudes que el texto tomará.

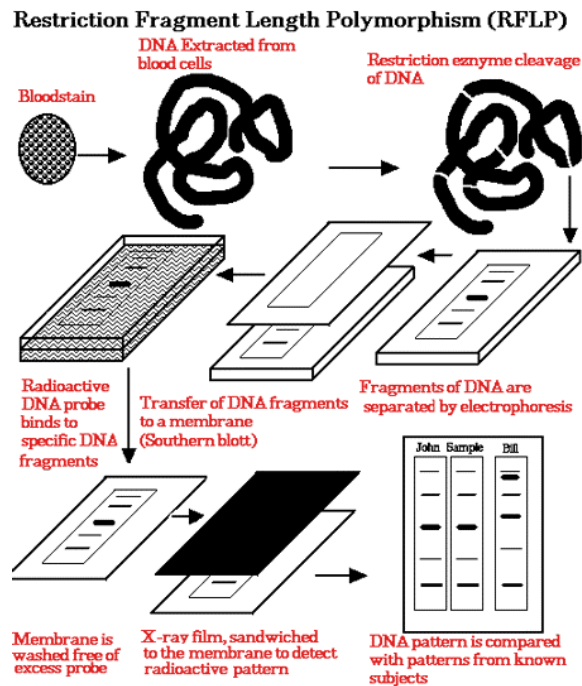


FIGURA 2. Técnica de RFLP⁴⁹

La información más útil que este tipo de estudio proporciona es el que una muestra biológica tomada como evidencia, proporcione la cantidad y calidad de ADN necesario, para que el científico forense pueda obtener el perfil genético³².

Otros factores que influyen en la calidad de la muestra para RFLP, es el efecto de las bacterias, hongos o levaduras. En muchas ocasiones el ADN extraído de una muestra consiste en una mezcla de ADN humano y bacteriano. Además, pueden estar presentes plásmidos en la bacteria. Aunque las sondas de ADN humano no son homólogas al ADN bacteriano, el ADN de plásmidos puede reaccionar a través de plásmidos vectores, los cuales pueden estar presentes en la sonda de ADN⁴⁹.

Ninguno de estos posibles contaminantes pueden dirigir a una falsa inclusión y la mejor manera de explicar las bandas adicionales que pudieran estar presentes es hibridando las muestras de ADN con sondas que contengan ADN plásmico y ADN ribosomal de bacterias⁸.

Esta metodología de análisis aún es utilizada por algunos laboratorios para resolver casos de paternidad.

Las desventajas más importantes para ser aplicadas en la resolución de casos criminales es la enorme cantidad de ADN que requiere y la alta calidad del mismo, condiciones que sólo en casos excepcionales se presentan en el ámbito criminal⁴⁹.

El desarrollo social ha traído consigo una modificación de la tipología delictiva, que la hecho relativamente frecuente determinados tipos de actos criminales caracterizados por su violencia con una notable desproporción de fuerzas entre víctima y agresor y por la utilización de instrumentos y armas que hacen que las evidencias o indicios dejados en el lugar de los hechos por el autor o autores sean mínimas. Paralelamente, el desarrollo científico ha posibilitado la aplicación de nuevas tecnologías que han ido profundizando en su capacidad identificadora sobre indicios cada vez más pequeños: el máximo exponente en el momento actual es la denominada tecnología del ADN⁵⁸.

La aplicación forense de los métodos de tipificación del ADN durante los últimos quince años, ha constituido un mayor avance en la evaluación de evidencias biológicas. Con su sensibilidad notable y poder de discriminación, el análisis del ADN se ha vuelto una figura importante en el campo de las ciencias forenses, medicina forense y pruebas de paternidad⁶⁰.

El análisis del ADN promete ser la herramienta más importante en la identificación humana desde que Francis Galton desarrolló el Liso de las huellas dactilares para el mismo propósito. Se puede predecir que en un futuro no distante será posible identificar a una persona con una certidumbre científica que está más allá de la duda razonable, incluso en problemas que actualmente se presentan como un desafío para la tecnología con la que cuenta el laboratorio de genética de la Procuraduría General del Distrito Federal, tanto en la mezcla de fluidos biológicos como en violaciones tumultuarias o bien, discernir entre gemelos idénticos⁷⁰.

La identificación de perfiles genéticos es una técnica que aparece a mediados de los 80's y se considera como una metodología relativamente joven. Sin embargo, como en muchas otras áreas de la ciencia, ésta en particular ha tenido un enorme desarrollo en muy corto tiempo, desde la aplicación de la "huella genética" hasta la implementación de la PCR⁶⁵ y el análisis de los STRs⁶⁴ han aparecido en la literatura científica una infinidad de investigaciones, desarrollos de tecnología y procedimientos pre-analíticos y analíticos que persiguen abatir tiempos, y costos en el material, reactivos y equipos que se utilizan en los laboratorios⁷⁸.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información existente sobre el tema, los errores en la toma de muestra, el embalaje y el envío al laboratorio, hacen necesario y urgente la documentación de la información básica con el fin de difundirla entre las personas involucradas en cada una de las etapas del análisis del ADN, incluyendo el lugar de hechos⁶³.

CAPÍTULO III



METODOLOGÍA DE LABORATORIO EN EL ANÁLISIS DE SEMEN

EXAMEN MACROSCÓPICO DE LA MANCHA

Los procedimientos que hay que seguir para la identificación de semen se llevan a cabo en varias etapas de la investigación, al laboratorio forense solo tiene a su cargo muestras colectadas que no siempre son tomadas por el mismo analista de tal forma que toda la información que quede registrada es de gran importancia, siendo el laboratorio solo un eslabón más en la gran cadena de investigación.

Dentro de la procuración de justicia hay varios elementos que influyen en la documentación de una investigación en la cual la pericia de un buen elemento en el lugar de los hechos adquiere gran importancia sobre todo porque un examen macroscópico de la mancha de semen será de gran importancia y relevancia debido a la pericia del analista que la observa si no hubiese gente observadora habría detalles que pasaran desapercibidos⁶³.

1. Regiones de Hallazgo

Se debe tener en cuenta que hay diversas regiones del hallazgo de semen, por ejemplo:

- a) Sobre la víctima: regiones corporales; ropas, colocarlas sobre el cuerpo o maniquí;
- b) Sobre el delincuente: regiones corporales; ropas, colocarlas sobre el maniquí;
- c) En el ambiente: muebles, decorados, paredes, piso, sábanas, líquidos de lavado, esponjas, pañuelos, etcétera³³.

2. El aspecto de la mancha con luz natural o artificial común

Sobre la piel al igual que sobre telas de seda forma pequeñas costras o películas; sobre objetos lisos son de color blanco amarillento; sobre tejidos rugosos o con pelos

tiene aspecto de *baba de caracol*, sin impregnación y con escamas sobre cada pelo; sobre tejidos que se impregnan forma las manchas en mapa, debidas a enjugamiento⁶³.

La morfología de las manchas de semen varía según el soporte donde se asienta. En la piel, cuando se deseca, adopta el aspecto de una fina película, como de pegamento, que clásicamente se suele comparar a un «rastros de caracol». Estas manchas deben buscarse tanto en la víctima como en el sospechoso, a nivel de zonas típicas: pubis, cara interna de los muslos, labios mayores, los pelos impregnados tienen un aspecto como engomado.

En los tejidos absorbentes forma unas manchas típicas, con una característica tiesura, como si el tejido estuviera almidonado. Si la mancha es reciente, tiene un olor típico. La morfología de la mancha es irregular, con unos contornos bien delimitados, que han justificado su comparación con «cartas geográficas». No obstante puede haber diferencias según el mecanismo de su producción: si se debe a una eyaculación, se produce una gran zona manchada con su típico aspecto en mapa; si se debe a una limpieza del meato o al enjugamiento del miembro, la mancha no tiene ese aspecto típico.

Es interesante señalar que la difusión de la mancha no se realiza de un modo homogéneo; se produce como un proceso cromatográfico, en el que los elementos celulares no difunde, quedando en el centro de la mancha.⁴⁸

3. Aspectos de la mancha con luz ultravioleta

Los signos de orientación derivan del aspecto macroscópico de las manchas y de su fluorescencia bajo la luz de Wood. Los rayos ultravioletas filtrados (luz de Wood) excitan la fluorescencia del esperma, que adquiere una coloración blanco azulada muy apreciable en cámara oscura; esta fluorescencia debida a la espermita,

se vuelve más viva y amarilla en las manchas antiguas. Esta propiedad no es específica, pues ciertos líquidos desecados (orina, moco nasal o vaginal) tienen una fluorescencia idéntica o parecida.

4. Textura de la mancha

La palpación de la mancha al tacto, sobre tela presenta una textura rugosa y dura.

5. Cantidad

La cantidad varía como particularidad individual; como frecuencia de las eyaculaciones y tiempo transcurrido entre ellas.

6. Olor

Sui generis atribuido a la secreción prostática.¹

IDENTIFICACIÓN DE SEMEN

Su color y aspecto es lechoso algo opalescente, con filamentos vítreos y granos semejantes a los de tapioca. La opalescencia es proporcional a la concentración de espermatozoides. Las manchas de semen pueden encontrarse en los lechos, en objetos situados a poca altura, sobre el suelo, en alfombras o tapetes, en las sillas, en los divanes, sobre los vestidos, el propio sujeto o la víctima, en pañuelos y papeles que pudieran haber servido para limpiarse los órganos genitales después del acto sexual, en los cuartos de baño.

El plasma seminal está integrado por sustancias bioquímicas, antigénicas, enzimáticas, lípidos y minerales. Según Villanueva Cañadas, la determinación cualitativa y cuantitativa de estos compuestos identifica el esperma.

Su aspecto depende del objeto sobre el que se encuentre, del modo como se haya impregnado y según sea su antigüedad. Sobre las telas absorbentes toma el aspecto clásico de cartas geográficas, deja manchas grises, de contornos netos, irregulares que acartonan la tela. En las telas son impermeables, aparecen como pinceladas de barniz. Sobre los pelos, constituye un magma grisáceo que los aglutina. Suponiéndose lucha entre agresores y víctimas, las manchas generalmente son pequeñas, angulosas, borrosas y deformadas. Sobre telas no absorbentes el esperma forma escamas o cadenas brillantes. Sobre la piel forma películas blanquecinas, semejantes a las del colodión. Lo mismo sucede en la madera. Al tacto, el esperma vuelve los tejidos rígidos y duros como almidonados³³.

Es muy difícil encontrarlo en estado líquido ya que tiende a secarse rápidamente, y haría falta llegar a la escena del crimen poco tiempo después de que ocurriera la eyaculación. Cuando se ha secado, dependiendo de la cantidad y concentración de espermatozoides, suele aparecer como una capa blanquecina que puede ser perfectamente identificada con la luz de Wood, ya que emite una fluorescencia característica. Cuando se mezcla con otros líquidos, especialmente agua, los espermatozoides tienden a precipitar en grupos de color blanco (que se pueden tinter del color del líquido), permaneciendo en este estado varias horas.

La luz de Wood debe usarse obligatoriamente en todos los delitos contra la libertad sexual y en aquellos en que se sospeche algún componente sexual, aunque algunos cuerpos de policía de otros países lo utilizan sistemáticamente por su sensibilidad en detectar manchas pequeñas (de sangre, semen, orina invisibles al ojo y a la iluminación normal).

RECOLECCIÓN DE MATERIAL

La metódica para recoger el material de examen será diferente según el problema planteado. Cuando se trata de una investigación sobre la víctima de una agresión sexual, según que el acceso carnal sea por vía vaginal, rectal o bucal, se procederá a la búsqueda del líquido espermático: con un escobillón o una torunda de gasa para la toma vaginal y rectal. En la boca se hará una limpieza en la parte posterior de los incisivos centrales.

Una parte del material se reservará sin manipular para la investigación de ADN (PCR) otra parte, para la investigación de espermios y otra para los componentes bioquímicos²⁸.

El tiempo poscoito en el que se pueden encontrar espermatozoides en la cavidad vaginal varía de unos autores a otros. SUMMER (1985) dice haberlos demostrado después de algunos días. RUPT (1969) encuentra espermios en vagina durante un período de 14 horas. GLAISTER ha detectado espermatozoides completos hasta después de 85 horas: En la cavidad rectal se pueden encontrar hasta 24 horas después y en la boca hasta 8 horas⁸⁹.

- Indicios en la cavidad vaginal. De modo general, hay que recoger y guardar en bolsas independientes toda la ropa de la víctima, especialmente las prendas interiores. Se debe proceder inmediatamente a un análisis ginecológico, detallado, tomando con muchísima precaución muestras de los genitales externos primero y posteriormente de la cavidad vaginal, siempre con hisopos estériles.
- Indicios en la cavidad oral o bucal. La víctima suele escupir y enjuagarse inmediatamente la boca, por lo que hay que preguntarle acerca del lugar donde hizo tales maniobras, por si fuera aún posible encontrar restos de semen. Hay que proceder a realizar (antes que cualquier otra maniobra) una toma de muestras con hisopos estériles para friccionar minuciosamente el interior de la boca (zona interna de los carrillos o mejillas), y posteriormente se deben de limpiar los dientes

(especialmente la cara interna de los incisivos superiores) y los espacios interdentes, por sus caras externa e interna, con hisopos finos o con palillos de dientes estériles.

Finalmente, se deben limpiar, con una gasa humedecida en agua, las comisuras de los labios y la parte externa de la cara, así como las manos y antebrazos, con las que se pudiere haber limpiado la víctima, ya que pueden quedar manchas pequeñas que proceden del acto instintivo de limpiarse la boca tras escupir (recordemos que la alta concentración de espermatozoides en el semen hace que cualquier indicio, por pequeño que parezca pueda ser útil). Por esta misma razón, habrán de recogerse pañuelos y prendas de vestir con mangas.

- Indicios en la cavidad anal. En los casos de supuesta violación por acceso carnal en la cavidad anal, las pautas analíticas son similares a las usadas en los supuestos de violación vaginal. Tras una valoración clínica de la víctima, procede realizar limpiado con hisopos o gasas humedecidas y realizar una aspiración o un lavado con un enema que tenga poca agua, para pasar a recoger el líquido. Igualmente, se pueden hacer extensiones en «portas» microscópicas para intentar visualizar espermatozoides⁵⁸.

DIAGNÓSTICO GENÉRICO

El examen genérico se orientará en una doble vertiente: La investigación de espermatozoides y la de espermina y colina, a las que se añade la investigación de la fosfatasa y los métodos inmunológicos.

EXAMEN MICROSCÓPICO

Permite visualizar, en algunas ocasiones, la presencia de espermatozoides; dato que confirma, sin duda alguna, que la mancha es esperma. La investigación de

espermios ha sido denominada prueba de certeza, ya que es la prueba reina del diagnóstico genérico. Puesto de manifiesto un espermatozoide completo en la mancha, esta queda identificada en cuanto a su naturaleza³³.

Si se investiga en el líquido, se coloca en un portaobjeto, se deseca, se fija, se colorea con azul de metileno. Los espermatozoides pueden ser teñidos de tono violeta con azul de metileno y de rojo brillante con eosina, eritrosina y alizarina roja. Debido a que la estructura de los espermatozoides varía de una especie animal a otra, es posible, determinar su origen⁷⁶.

REACCIÓN DE ESPERMINA Y COLINA

El hecho de no descubrir un espermatozoide completo no debe llevar a concluir que la mancha no es de esperma. La investigación de los espermios en una mancha de esperma puede ser negativa debida a azoospermio⁸⁹.

Las reacciones microcristalográficas de Florence y Barberio basadas respectivamente, en la identificación de cristales de colina y de espermina, actualmente ya no son muy usadas, ya que solo permiten formular juicios de probabilidad, por lo tanto, su valor es relativo.

Se han desarrollado pruebas complementarias, que realizadas con metodología idónea, poseen una considerable importancia. Actualmente se utilizan técnicas más confiables para la identificación de colina y espermina, como son las electroforéticas y las enzimáticas.

Técnicas electroforéticas²⁸: Tienen la ventaja de ser más confiables que las pruebas cristalográficas, el simple método electroforético puede poner en evidencia la presencia de espermina y colina. El tejido manchado que resultó fluorescente a la luz de Wood se macera en HCl 0.1 N, durante 12 horas. Se centrifuga, manteniendo

el tejido fuera del líquido por medio de un hilo que se sujeta al borde del tubo con un papel adhesivo.

En una hoja de papel Schleicher–Schull, se traza una línea a 4 cm del borde inferior. Sobre esta línea se marcan tres puntos, distantes entre sí. En uno se colocará la mancha problema; en otro un estándar de colina, y en el tercero, un estándar de espermina. Se hace el desarrollo electroforético, usando un tampón de piridina/ácido acético/agua, de pH 3.9 a un voltaje de 350 V durante una hora y 50 min.

Concluido el desarrollo se seca el papel en estufa a 80°C por 30 min. La colina aparece como una mancha de color rojo ciclamen, que se sitúa aproximadamente a 17 cm del punto de partida.

La espermina aparece como una mancha de color calabaza, que se sitúa a unos 21 cm de la línea de base.

Técnica enzimática: Son técnicas complejas que aún no han entrado en la práctica.

REACCIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA PROSTÁTICA

El principio del método³³ consiste en incubar un sustrato fosforado con la mancha o un extracto de ésta. La fosfatasa presente desdoblará el compuesto en fósforo y el correspondiente compuesto orgánico. Como índice de la reacción puede medirse el fósforo inorgánico liberado o el compuesto orgánico. Se han propuesto diversos sustratos para la reacción: fenilfosfato; *p*-nitrofenilfosfato y α -naftilfosfato. Actualmente se utilizan los kits comerciales sustituyendo el suero por un macerado de mancha con un tampón de citrato pH 4.8. El valor de esta prueba radica en la alta concentración de fosfarosa ácida existente en el tejido en que radique una mancha de esperma.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Es ya antiguo el conocimiento de que el líquido espermático posee proteínas específicas (Landsteiner en 1899). Weil y Cols (1956–1962) demostraron la presencia en los espermatozoides de un antígeno, denominado antígeno de revestimiento (spermatozoa coating antigen, SCA).

Especificidad antigénica de los espermatozoides. El SCA procede de las vesículas seminales, de modo que los espermatozoides obtenidos directamente del testículo no lo poseen. Es un potente antígeno que produce respuesta inmunitaria en el animal y en la mujer en las primeras relaciones sexuales. Se puede poner de manifiesto por el test de la hemaglutinación pasiva, donde los hematíes tratados con formaldehído son sensibilizados por anticuerpos anti-SCA. Así, aglutinan en presencia del correspondiente antígeno.

Especificidad antigénica de órgano del plasma seminal. Cuando se inyecta esperma humano total a un conejo, se obtiene una respuesta de anticuerpos que se pueden cifrar en cinco u ocho bandas diferenciables por inmunoelectroforesis. De esos antígenos de menos cuatro son comunes con el suero humano³³.

Otra prueba que permite emitir juicios de certeza, es la presencia de la proteína P30 considerada un marcador específico de semen; es producida por la próstata y secretada al plasma seminal, identificada mediante la técnica de Ouchterlony o inmunoelectroforesis.

La detección del Antígeno Prostático Específico (P30 o PAS) por el método de ELISA es altamente sensitivo y específico en la identificación de semen (menos de 1 ng/mL), además de ser útil en los casos en que el individuo es azoospermico⁴⁸.

DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO

En lo referente a saber si una mancha de semen es humano o de otra especie animal, se establece a través de las técnicas inmunológicas, por lo que se hace simultáneamente con el diagnóstico genérico³³.

DIAGNÓSTICO INDIVIDUAL

El método de los grupos específicos (isoaglutinaciones), se funda en que las propiedades aglutinantes grupo–específicas no existen solamente en la sangre, sino también en la mayor parte de los líquidos orgánicos, y sobre todo en el esperma (tanto en los espermatozoides como en el líquido seminal)⁷³.

Se han propuesto varios métodos:

La prueba de *Landsteiner y Richter* consiste en poner en contacto una gota de maceración de la mancha sospechosa, una de suspensión globular fresca del autor del atentado. Si la reacción es positiva, se procede al estudio del grupo sanguíneo de este individuo. Puede no tener ningún resultado en particular si el grupo es AB (grupo desprovisto de aglutininas).

Si la reacción es negativa, se pone en presencia de la maceración de la mancha una suspensión globular de cada tipo sanguíneo y se observan los resultados. Sin embargo, ciertos fenómenos físico–químicos (sol, frío, putrefacción, acción de ácidos, etc.), destruyen la aglutinina, que es más débil que el aglutinógeno.

Procedimiento. Se cortan fragmentos de tela de 1 x 1 mm y se impregnan con la muestra problema y con los testigos. Cada uno de los fragmentos se coloca en los tubos respectivos como se muestra en la figura.

| | PROBLEMA | CONTROL | TESTIGO |
|--------|----------|---------|---------|
| Anti-A | ○ | Ⓐ | ○ |
| Anti-B | ○ | Ⓑ | ○ |
| Anti-H | ○ | ⓪ | ○ |

***Se indica la manera en que se trabajan los antisueros (filas)
con el problema, el control y el testigo (filas)***

Se colocan tres gotas de anti-A; tres gotas de anti-B en su hilera y tres gotas de anti-H, se agitan vigorosamente y se deja que se efectúe la absorción durante toda la noche en refrigeración a 4°C para después centrifugar y remover el sobrenadante y colocarlo en una lámina hemoclasificadora.

Se agrega una gota de suspensión de eritrocitos al 2% de A en cada uno de los tubos de la hilera anti-A; una gota de células B en la hilera de anti-B y del grupo O en la hilera de anti-H; se agita mecánicamente durante 10 a 12 minutos y se esperan otros 9 minutos más. Se lee al microscopio.

1. Si se observa aglutinación con anti-A y con anti-B, pero no con anti-H, el grupo será O.
2. Si hay aglutinación en los tubos con anti-B y con anti-H y no con anti-A, el grupo será A.
3. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H pero no con anti-B el grupo será anti-B.
4. Si no existe aglutinación con anti-A ni con anti-B, pero sí con anti-H, el grupo será AB²⁸.

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Hasta hace poco tiempo los procedimientos para efectuar un diagnóstico genético eran muy burdos. Apenas en 1956 se descubrió que el número normal de cromosomas en cada célula es de 46. Este avance fue consecuencia de una metodología más depurada e hizo a su vez posible descubrir, en 1959, que el poseer un cromosoma de más (el número 21) era la causa del síndrome de Down. A esta observación siguieron otras relacionando otros defectos cromosómicos con otras enfermedades¹⁸.

En 1960 se desarrolló otra clase de diagnóstico genético con implicaciones muy diferentes. Bobo Guthrie, de la Universidad del estado de Nueva York en Buffalo, y que permite identificar una enfermedad hereditaria del metabolismo.

El nuevo diagnóstico genético basado en el análisis directo del DNA no sólo será útil en lo que respecta a enfermedades hereditarias o a cáncer. Ya es posible el determinar, con absoluta precisión, de quién provino una muestra de DNA contenida en apenas unas gotas de sangre, de semen o, en teoría, ¡incluso de un solo cabello! Apenas hace falta señalar la enorme trascendencia de este análisis, llamado de huellas digitales del DNA⁹⁵.

A mediados de los ´80 comienzan a desarrollarse sistemas de identificación de individuos basados en el estudio de polimorfismos de ADN, los cuales reflejan la amplia variación de secuencias localizadas en diferentes regiones del genoma⁹³.

La variabilidad de estas zonas radica en diferencias exhibidas por el material genético, en la secuencia nucleotídica misma a través de sustituciones de nucleótidos, o en la distinta longitud generada por una misma secuencia que se repite un número diferente de veces, como fuera demostrado por primera vez por Wyman and White (1980). Comenzaron a ser estudiadas cuando fue posible conocer su localización y desarrollar una metodología adecuada para ponerlas de manifiesto, mediante sistemas de análisis cada vez más precisos y sencillos³.

A mediados de los '80, empleaban fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas, separados electroforéticamente y transferidos a un soporte sólido, el cual se trataba con una sonda constituida por secuencias complementarias de las regiones variables, marcada radiactivamente. Por autorradiografía, resultaba posible observar varias bandas, de localización desconocida dentro del genoma, pero que eran características de cada individuo y se heredaban de padres a hijos⁶⁰.

Si bien las bandas producidas por estas sondas multilocus eran muy variables de una persona a otra, los resultados eran difícilmente reproducibles, ya que pequeñas y poco controlables diferencias en la corrida electroforética (voltaje, tiempo, concentración del gel) afectaban en gran medida la reproducibilidad e interpretación de los resultados.

El descubrimiento de regiones hipervariables del genoma con localización específica (Nakamura et al, 1987) permitió el desarrollo de las sondas de locus único que resolverían el problema, posibilitando el estudio de una zona conocida del genoma que se visualizaba como dos únicas bandas para la condición heterocigota, correspondientes cada una a un alelo, heredado de cada progenitor⁷⁸.

Estas zonas están constituidas por secuencias repetidas, que aparentemente carecen de función como codificantes de proteínas. La menor variabilidad exhibida por estos sistemas de análisis se solucionaba empleando un conjunto de cuatro o más sondas unilocus que evaluaban otras tantas regiones del genoma⁸².

Sin embargo, aún persistía un inconveniente para el empleo masivo de estas metodologías en la práctica forense: las sondas multilocus, y en menor medida las unilocus, requerían un ADN en estado óptimo en cuanto a su integridad, de alto peso molecular, lo cual rara vez ocurre en cadáveres en proceso de descomposición, o en manchas antiguas de fluidos biológicos o expuestas a condiciones ambientales adversas.

La solución llegó con el desarrollo de técnicas de amplificación o copiado de porciones de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR⁸¹, con las

cuales fue posible implementar sistemas de análisis de secuencias más pequeñas (microsatélites o STRs), pero menos variables que las anteriores⁵⁶. Con el advenimiento de esta nueva técnica, se hizo posible la evaluación de polimorfismos en cuanto a la secuencia nucleotídica de la región variable, además de las diferencias de longitud.

La permanente innovación metodológica exige la actualización y perfeccionamiento de los sistemas validados por la comunidad forense internacional, que cuenta al presente con la posibilidad de evaluar un centenar de regiones variables del genoma.

El estudio de tejidos humanos provenientes de desastres en masa (atentado a la Embajada de Israel y a la mutual israelita AMIA, entre otros), permitió diseñar nuevos métodos de análisis rápido y evaluar la eficiencia de los sistemas conocidos. Finalmente, la identificación de secuencias ubicadas en el cromosoma Y humano y su distribución intra e interpoblacional, encarada en la Argentina por nuestro grupo como parte de un estudio a nivel mundial, constituyó un importante aporte a las ciencias forenses y antropológicas⁶⁴.

Estos sistemas, optimizados para su análisis en reacciones múltiples, se emplean actualmente en casos de paternidad discutida sobre un hijo varón, cuando el supuesto padre no se encuentra disponible o se niega al estudio, analizándose cualquier hombre perteneciente a la misma patrilinea que el progenitor ausente: la coincidencia de las secuencias variables del cromosoma Y será total, de existir el vínculo biológico⁷³.

Resultan además de gran utilidad en el estudio de evidencias provenientes de delitos sexuales, donde puede establecerse el patrón genético del emisor del semen sin la habitual contaminación con el ADN de la víctima.

En su conjunto, el desarrollo de nuevas metodologías de análisis que hacen posible la identificación de individuos, restos humanos y rastros biológicos, constituye una nueva y valiosa herramienta forense⁹⁵.

Ubicación de la evidencia del ADN en el lugar de los hechos

La molécula del ADN está presente en cada célula nucleada y por lo tanto está presente en materiales biológicos dejados en el lugar de los hechos. El ADN se ha aislado exitosamente y analizado de una gran variedad de materiales biológicos. La aplicación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha ampliado el intervalo de muestras susceptibles a ser analizadas debido a que se obtienen una gran cantidad de copias de los marcadores que serán examinados. Los materiales más comúnmente analizados en laboratorios forenses son sangre, semen, manchas de sangre o manchas de semen⁵⁹.



La evidencia de ADN puede ser recolectada de casi cualquier cosa. El ADN ha ayudado a resolver muchos casos cuando los investigadores han recuperado muestras de fuentes no tradicionales. Se han documentado casos en los que se establece una clara relación biológica entre las muestras recolectadas del lugar de los hechos y las personas involucradas directamente con un delito³³.

Numerosos casos se han resuelto por el análisis de ADN de saliva en colillas de cigarrillos, estampillas postales, y el área alrededor de la apertura bucal de las máscaras para esquiar. Actualmente se cuenta con estudios serios que sugieren la alta probabilidad de recuperar ADN valioso a partir de impresiones dactilares⁶³.

Debido a que sólo unas pocas células son suficientes para obtener información de ADN útil, la siguiente lista identifica algunos objetos comunes de evidencia que puede ser necesario recolectar, la posible localización del ADN sobre

la evidencia, y la fuente biológica que contiene las células. Hay que recordar que por el hecho de no observar una mancha no significa que no existen suficientes células de ADN para tipificar. Además el ADN hace más que justamente identificar la fuente de la muestra; también puede ubicar a un individuo conocido en el lugar de los hechos, en una casa, o en un cuarto donde el probable responsable dijo no haber estado. Puede argumentar autodefensa y colocar un arma en las manos de la víctima. Puede cambiar la historia desde una coartada aceptable, posible y probable. Aquí es donde radica la importancia del conocimiento de la prueba. Mientras más peritos, criminalistas, Ministerios Públicos y Jueces conozcan cómo usar el ADN, más poderosa se vuelve esta herramienta³⁸.

A continuación se ofrece información sobre las posibles fuentes de ADN:

| EVIDENCIA | POSIBLE LOCALIZACIÓN DEL ADN | FUENTE DE ADN |
|---|---|---|
| Bat de béisbol o similar | Donde se colocan las manos o en el extremo del bat | Sudor, piel, sangre, tejido y pelo |
| Sombrero, pañuelo | Dentro | Sudor, pelo, caspa |
| Anteojos | Lentes y espacios que tienen contacto con la nariz y las orejas | Sudor y piel |
| Toallas faciales, hisopos con algodón (cotonetes) | Superficie | Moco, sangre, sudor y cerilla |
| Ropa sucia | Superficie | Sangre, sudor, semen y saliva |
| Palillos | Punta | Sangre, sudor y saliva |
| Cigarros usados | Colilla de cigarro | Saliva |
| Estampillas o sobres | Área de engomado | Saliva |
| Tapa o ligadura | Superficie interna y externa | Piel y sudor |
| Lata o envases de vidrio | Lados y área que tiene contacto con la boca | Saliva y sudor |
| Condón usado | Superficie interna y externa | Semen, células del epitelio uretral, células vaginales o rectales |
| Cobija, almohada o sábana | Superficie | Sudor, pelo, semen, orina y saliva |
| Bala | Superficie externa | Sangre y tejido |
| Mordida | Piel de la víctima o ropa | Saliva |

Los diferentes tipos de muestras biológicas pueden ser utilizadas para excluir un individuo de su participación en un crimen. En particular, la transferencia directa de ADN de un individuo a otro o a un objeto puede ser usada para relacionar a un sospechoso con el lugar de los hechos⁵¹. Esta transferencia directa puede involucrar:

1. El ADN del sospechoso depositado sobre el cuerpo de la víctima o su ropa.
2. El ADN del sospechoso depositado en un objeto.
3. El ADN del sospechoso depositado en un lugar.
4. El ADN de la víctima depositado sobre el cuerpo del sospechoso o su ropa.
5. El ADN de la víctima depositado en un objeto.
6. El ADN de la víctima depositado en un lugar.
7. El ADN del testigo depositado sobre una víctima o el sospechoso, o
8. El ADN del testigo depositado sobre un objeto o lugar.

La recolección de evidencia de ADN en el lugar de los hechos debe ser realizada cuidadosamente, y debe cuidarse también la cadena de custodia con el fin de producir perfiles de ADN que sean significativos y legalmente aceptados en el juzgado. Las técnicas de ADN se han transformado en técnicas altamente sensibles que incluso aquellas muestras tan pequeñas que no puedan ser observadas a simple vista, pueden ser utilizadas para relacionar al probable responsable con el lugar de los hechos. La evidencia debe ser recolectada, preservada, almacenada y transportada cuidadosamente al laboratorio de ADN.

CRITERIOS CONVENCIONALES DE IDENTIFICACIÓN HUMANA

La identificación de individuos

Una de las acepciones de la palabra Identificar es reconocer si una persona es la que se busca⁶⁸. Es decir, se trata de establecer su individualidad determinando

aquellos rasgos o conjunto de cualidades que la distinguen de todos los demás y hacen que sea ella misma.

Las cuestiones relacionadas con la identificación de las personas tienen una enorme importancia en Medicina Legal, tanto en el caso de sujetos vivos como de cadáveres²⁹.

Conceptos aplicados a personas vivas

En la identificación de delincuentes, enfermos mentales con amnesia, menores sin documentos, etc., resultan de utilidad las siguientes observaciones, siempre y cuando se cuente con archivos o datos suministrados por otras personas⁷⁰.

Exámenes generales

Datos fisonómicos: la descripción de los rasgos fisonómicos constituye el medio más simple para la identificación, al que recurrimos en nuestra vida diaria: reconocemos visualmente a las personas cuyas facciones hemos registrado previamente en nuestra memoria.

Existe además una memoria institucional, como la que poseen el Registro Civil y la Policía, que consiste en un archivo de fotografías de las personas en documentos de identidad.

- Sexo: su determinación no ofrece dificultades, excepto en casos complejos de hermafroditismo.
- Peso, talla y edad estimadas.

- Sistema piloso: color, tipo y forma de implantación del cabello, o su ausencia.
- Color de ojos y piel.
- Marcas particulares: cicatrices, defectos congénitos, tatuajes y estigmas profesionales.
- Huellas dactilares: Son las impresiones que dejan los pulpejos de los dedos manchados con tinta, sudor u otros líquidos, sobre una superficie pulimentada, constituidos por surcos y crestas que dan lugar a figuras siempre diferentes, gracias a lo cual permiten la identificación de las personas.
- Las huellas dactilares se prestan a una clasificación coherente y a su ordenación en archivos de sencilla localización (Galton, 1892; Henry, 1900; Jiménez Jerez, 1913). No se han hallado dos personas en las que sean idénticas, ni aún en los gemelos univitelinos⁴⁶.
- Registro de la voz: La frecuencia y amplitud de las vibraciones de las cuerdas vocales resultan propias e idénticas para cada persona, incluso si se intenta disimular la voz (Kersta, 1962).
- Por otra parte, mediante la aplicación de métodos lingüísticos analíticos, es posible obtener indicios sobre la edad, sexo, nivel cultural, ocupación y antecedentes geográficos y étnicos del hablante (Manual de Ciencias Forenses, FBI).
- Trazado caligráfico: La firma y el trazado caligráfico presentan características propias del ejecutor, que pueden conducir a su identificación comparándolos con los obrantes en archivos o escritos indubitados (Del Picchia, 1993).
- Guzmán (1994) afirma que del mismo modo que no hay dos seres humanos idénticos, tampoco hay dos escrituras idénticas: las peculiaridades físicas y

mentales de cada individuo originan personalidades gráficas indiscutiblemente únicas y diferentes unas de otras.

- En tal sentido, debe tenerse en cuenta que para la confección de un escrito existen, además de impulsos cerebrales inconscientes, mecanismos motrices muy automatizados que, si bien soportan cambios graduales en el curso de la vida, no hacen perder los elementos básicos de la escritura.
- Huellas genéticas: Desde mediados de la década pasada, el estudio de regiones hipervariables presentes en el genoma humano resulta de gran utilidad en la identificación de individuos, a partir de un registro previo o bien de sus familiares biológicos. Dado que estas secuencias son heredables, permiten además efectuar estudios de paternidad, a diferencia de los sistemas de identificación previamente mencionados³².

LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS POR TÉCNICAS BIOQUÍMICAS QUE EVALÚAN EL FENOTIPO

Las técnicas bioquímicas de identificación de individuos, previas al conocimiento actual del ADN, se basaban en la comparación de productos de expresión de diferentes genes. Estas proteínas, como los antígenos eritrocitarios (grupos sanguíneos), enzimas eritrocitarias, proteínas plasmáticas y antígenos de histocompatibilidad (HLA), son marcadores que se transmiten obedeciendo a las leyes mendelianas de la herencia⁶⁸:

- a) Grupos sanguíneos:** Sus antígenos se hallan en la superficie de los glóbulos rojos, y sus correspondientes anticuerpos forman parte de las inmunoglobulinas del plasma.

Los antígenos del sistema ABO se hallan también en otras células y en fluidos corporales (saliva, orina, semen, leche) en individuos secretores. Al sistema ABO, descubierto en 1901 por Landsteiner, se fueron agregando posteriormente otros, como el RH, MNS, Duffy, Lewis, Kidd, Lutheran, etc. En conjunto, presentan un rango de probabilidad de exclusión (es decir, de excluir la paternidad biológica de padres falsamente alegados), de alrededor del 75 %⁶⁴.

b) Proteínas plasmáticas: Las más frecuentemente utilizadas como marcadores genéticos en las pruebas de filiación son la haptoglobina, alfa-1- antitripsina, transferrina, proteínas grupo específicas Gc, orosomucoide, factor B del sistema properdina, fracción C3 del complemento, alotipos Gm y Km, de cadenas pesadas y livianas de inmunoglobulinas. Su rango de probabilidad de exclusión es de alrededor de 71%.

Enzimas eritrocitarias: Las que presentan mayor polimorfismo son la fosfatasa ácida eritrocitaria (EAP), adenilato kinasa (AK), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), fosfoglucomutasa (PGM), esterasa D (EsD), adenosín deaminasa (ADA), fosfogluconato dehidrogenasa (PGD) y glioxalasa (GLO). El rango de probabilidad de exclusión oscila en el 61%.

Antígenos de histocompatibilidad (HLA): Están codificados por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, ubicados en los loci A, B, C, D, DR, DQ y DP del brazo corto del cromosoma 6.

Los antígenos HLA-A, B y C están presentes en todas las células nucleadas del organismo; en cambio los HLA-D y R se distribuyen en forma más limitada: sobre linfocitos B, macrófagos, espermatozoides, células de Langerhans, etc.. Presentan en su conjunto un rango de probabilidad de exclusión de aproximadamente 95%.

Las pruebas de HLA en estudios de paternidad comenzaron a ser aceptadas en las Cortes a partir de principios de los '70, aunque su origen científico se sitúa unos

15 años antes por su utilidad en otra área de la identificación humana: la determinación de la compatibilidad entre dador y receptor de un transplante de órganos.

A partir del descubrimiento de polimorfismos hipervariables en el ADN por Wyman and White (1980), y de la posibilidad de emplearlos en identificación humana, lograda por Jeffreys (1985), los rangos de probabilidad de exclusión se incrementaron enormemente, a más del 99,99 %, superando incluso a la aplicación de todos los sistemas anteriores en conjunto⁴⁵.

Reseña histórica

En orden cronológico, puede decirse que el puntapié inicial de los análisis de ADN se produce en abril de 1985, cuando el primer caso judicial es resuelto por aplicación de técnicas moleculares de caracterización de secuencias hipervariables en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Jeffreys et al., 1985a).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las Huellas Digitales Genéticas (HDG) o "DNA-Fingerprinting" permitieron aclarar una disputa por inmigración a Gran Bretaña (Jeffreys et al 1985b). Poco tiempo después, una corte civil inglesa acepta la evidencia de ADN en un caso de paternidad discutida.

El debut de esta prueba en la investigación criminal se produce en octubre de 1986, en un caso de homicidio en el que se comprobó la inocencia del principal sospechoso (Gill and Werret, 1987; Wong et al., 1987).

Recién a partir del año 1987, las pruebas de ADN son admitidas como evidencia en las Cortes Criminales de Gran Bretaña y de Estados Unidos.

En 1988 se desarrollan técnicas de amplificación de ADN de pequeñas regiones variables del genoma, partiendo de sólo 1700 células diploides, equivalentes a unos 10 nanogramos de ADN (Saiki et al, 1988).

Estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* ("Polymerase Chain Reaction" o PCR)⁶⁵, emplean iniciadores o *primers*, que son secuencias de ADN complementarias de las zonas flanqueantes de la zona de interés (Jeffreys et al, 1989), que es amplificado por una ADN polimerasa durante ciclos térmicos adecuados, lográndose millones de copias de la región.

En 1989, y a causa de estudios de dudosa verosimilitud efectuados por la empresa americana Lifecodes Corp. en un caso criminal, se discute en los Estados Unidos la validez científica de estas pruebas para uso forense (Lander, 1989), resultando en una revisión crítica de las técnicas utilizadas por los distintos grupos de investigadores.

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 que se disponga de la certeza metodológica de su realización. La estandarización de las mismas ha sido encarada, entre otros, por los laboratorios del FBI (FBI Academy, Quantico, 1989)³⁹.

La razón fundamental de la amplia difusión de estas técnicas estriba en el hecho de que, mientras la serología clásica y los marcadores genéticos evaluables fenotípicamente presentan un número muy limitado de genotipos posibles, el continuo descubrimiento de nuevas regiones hipervariables en el ADN resuelve el problema de la identificación certera de individuos y del establecimiento de vínculos biológicos de parentesco (Chakraborty and Jin, 1993).

En los primeros trabajos con utilización de las técnicas de PCR, si bien resultaba posible evaluar regiones de una muestra de ADN que podía estar muy

degradada, la escasa variabilidad entre los individuos componentes de la población general conspiraba contra la certeza incriminatoria del análisis: era factible que una evidencia coincidiera con un sospechoso por azar, y mucho más aún, que a un padre alegado le fuera atribuida erróneamente la paternidad biológica de un descendiente putativo.

A partir de los ´90, la posibilidad de evaluar un gran número de sitios variables localizados en diferentes zonas del genoma (Edwards et al, 1991), permitió analizar, aunque fuera parcialmente, muestras de tejido humano quemado y en estado de putrefacción, como el derivado del atentado a la Embajada de Israel (Corach et al, 1992).

Posteriormente, la incorporación de un número aún mayor de sistemas hizo posible el establecimiento de vínculos biológicos de parentesco a través de secuencias de ADN de muy pequeño tamaño, con lo cual se logró la identificación de cadáveres momificados, con reducción ósea total o quemados (Penacino and Corach, 1993; Penacino et al, 1994c).

MÚLTIPLES ALTERNATIVAS DE ANÁLISIS DE ADN

A la luz del conocimiento actual, los sistemas de análisis de ADN pueden dividirse en dos grandes grupos: los basados en diferente longitud de la región variable, debidos a VNTR (Variable Number Tandem Repeats; repeticiones en tandem de número variable)⁷⁸, y los basados en diferencias en la secuencia nucleotídica.

Los polimorfismos de longitud pueden ponerse de manifiesto mediante enzimas de restricción (RFLPs) o por amplificación de la región variable. En ambos casos, el resultado observable es similar: diferentes individuos presentan distinta

longitud de los fragmentos de ADN obtenidos luego del corte con la enzima de restricción seleccionada o de la amplificación de la región de interés.

Sistemas basados en diferente longitud de la región variable

- **Evaluación de minisatélites:** Los minisatélites son regiones del genoma no codificantes, con más de 600 pares de bases de tamaño. En los que involucran unidades repetidas, cada una presenta, por lo general, entre 12 y pocos cientos de pares de bases. Pueden evaluarse mediante:
- **Transferencia del ADN a soportes sólidos (técnica de Southern):** Se emplea una sonda o *probe* complementaria de la región hipervariable. Las sondas se clasifican, de acuerdo con la localización y número de sitios que presentan sus secuencias complementarias en el genoma, como:
- **De locus múltiple:** Estas sondas reconocen (hibridizan) a diferentes regiones del genoma, ubicadas en distintos cromosomas, cuya localización precisa se desconoce, produciendo *DNA-fingerprints* (huellas digitales genéticas) individuo-específicos sobre una membrana que contiene ADN fragmentado enzimáticamente y separado por electroforesis. Las bandas obtenidas se heredan mendelianamente, por lo cual provienen en forma aproximada en un 50 % de cada uno de los progenitores.

Entre ellas, las denominadas 33.6 y 33.15, desarrolladas por Jeffreys (1985a) que detectan unos 17 fragmentos variables de DNA por individuo, de entre 3.5 y 20 kilobases, o bien el fago M13, que posee secuencias capaces de generar huellas digitales genéticas (HDG), individuo-específicas (Vassart et al., 1987).

Otro ejemplo de este tipo de sondas lo constituyen los oligonucleótidos, en secuencias repetidas 5 veces CAC/GTG que también son generadores de *fingerprints* (Nurnberg et al., 1989).

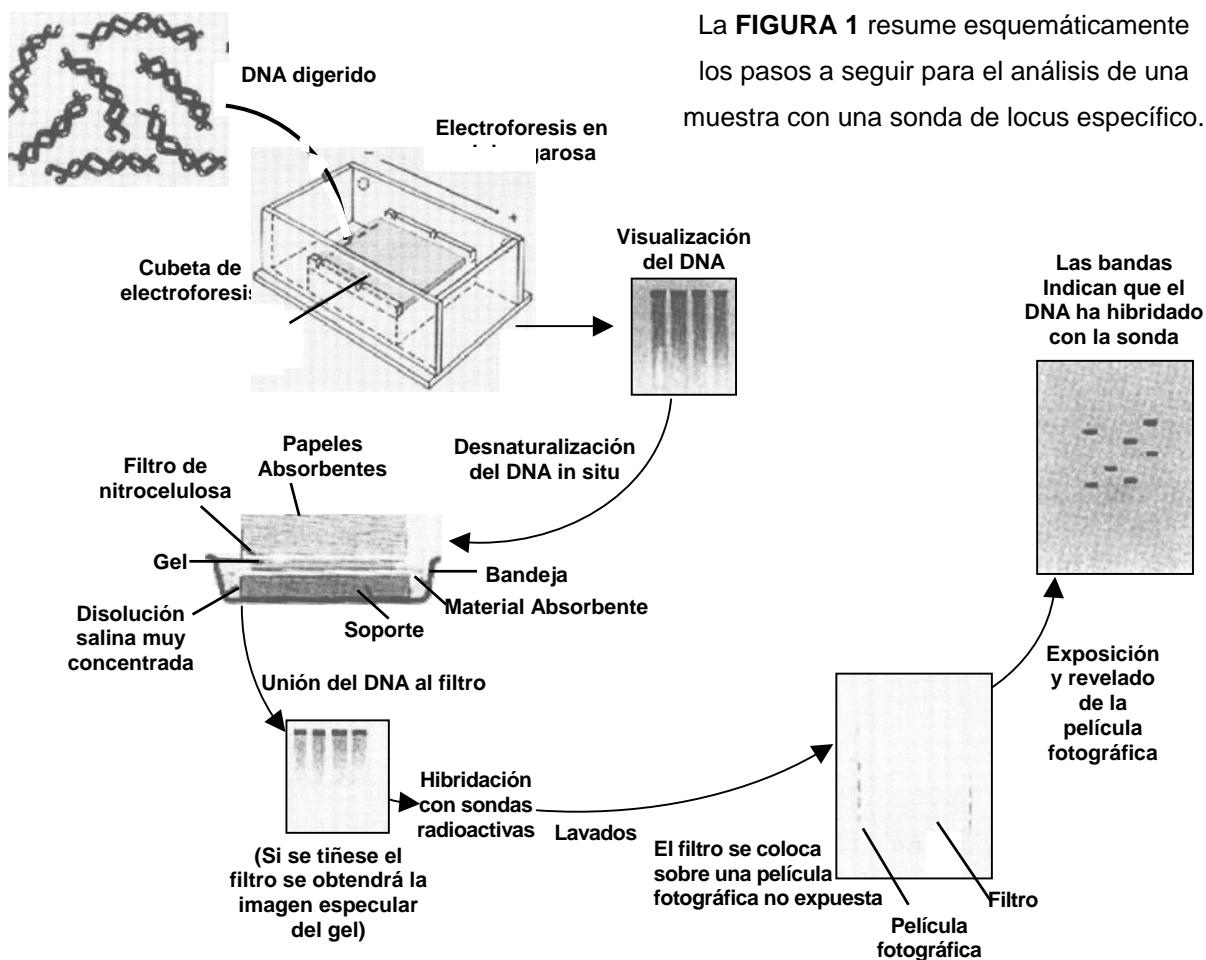
Si bien son sumamente informativas para caracterizar a un individuo, presentan dos inconvenientes que las hacen inapropiadas para los estudios forenses: por un lado, requieren un ADN en buen estado de conservación, de alto peso molecular, que no suele obtenerse a partir de muestras de interés forense; y por otro, dependen de variables experimentales de difícil estandarización, lo que hace casi imposible reproducir los resultados.

- **De locus único o locus específicas:** detectan un solo locus hipervariable con una banda por alelo; dada la naturaleza diploide de los humanos, se obtienen patrones de dos bandas (heterocigotas), o patrones de una banda (homocigotas, con alelos de similar tamaño).

Su variabilidad está dada por secuencias que se repiten un cierto número de veces, generándose fragmentos de restricción de diferente tamaño (VNTRs), más grandes cuanto más veces esté repetida dicha secuencia. Son altamente polimórficas, por ejemplo, para la sonda YNH24 se han detectado alrededor de 70 alelos de distinto tamaño en la población mundial⁸³.

Cabría esperar que esta multiplicidad produjera una muy alta capacidad resolutive, sin embargo, algunos alelos se encuentran mucho más representados que otros en la población, por lo cual la mayor o menor certeza de los estudios efectuados dependerá de los análisis de las frecuencias poblacionales para cada variante alélica o banda, que presente cada sistema en particular. Estos estudios deben realizarse previamente sobre muestras tomadas al azar de individuos no relacionados, de aquella población de la cual emergen las muestras a ser analizadas⁸⁶.

La certeza del análisis puede incrementarse utilizando un conjunto de varios loci hipervariables (Wong et al, 1987; Smith et al, 1990), lo cual disminuye prácticamente a cero la probabilidad de error.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR o Polymerase Chain Reaction)

La amplificación mediante PCR⁶⁴ requiere pequeñas secuencias de ADN sintético los que actúan como iniciadores o *primers*, que son complementarios de las regiones flanqueantes de la zona de interés. Se produce mediante varios ciclos (generalmente de 25 a 35), cada uno de los cuales consta usualmente de tres pasos, efectuados mediante cambios de temperatura:

- I. Desnaturalización: ruptura de los puentes de hidrógeno, quedando el ADN como simple cadena.
- II. Reasociación o *annealing*: los *primers* se reasocian a las zonas complementarias.

III. Extensión: se sintetiza ADN, con los nucleótidos y una ADN polimerasa que se hallan en la mezcla de reacción, generándose al final del proceso millones de copias de la región de interés.

IV. Esquemáticamente, la reacción de amplificación se representa en la Figura 2.

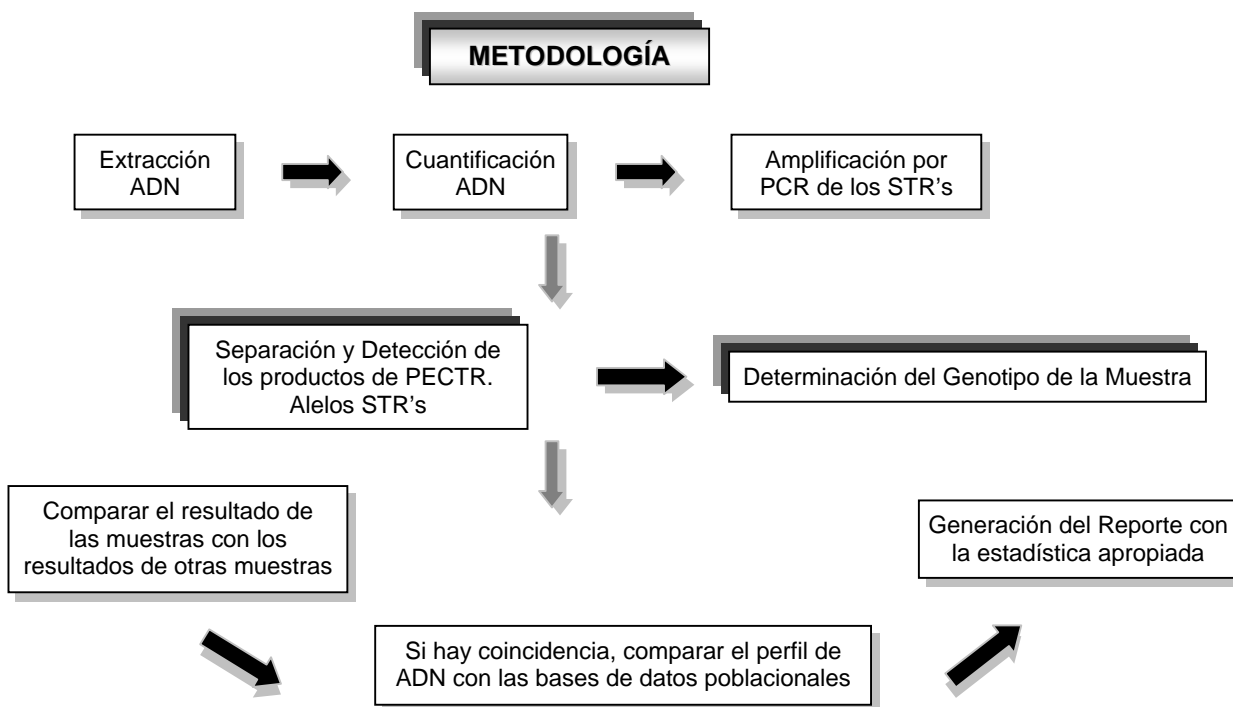


Figura. 2

El uso de la enzima termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada Taq polimerasa para la "extensión" (Saiki et al, 1988), permitió la automatización del proceso mediante el empleo de cicladores térmicos electrónicos. El análisis genético podría efectuarse, entonces, en forma eficiente y fidedigna aún a partir de una simple célula (Jeffreys et al.1988, 1990)⁸¹.

Si bien se detectaron varios sistemas de minisatélites analizables por amplificación por PCR y análisis del tamaño de los productos⁸³ p-FLP o Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) como el Apo B (Boerwinkle et al, 1989), el YNZ-22 (Wolff et al, 1988), y el COL2A1 (Wu et al, 1990), tal vez el sistema más difundido lo constituye la región altamente polimórfica, de gran tamaño, constituida por 16 pares de bases repetidas de 18 a 42 veces, que se halla ubicada

en el locus D1S80 y presenta 22 alelos detectados en la población general (Budowle et al, 1991; Sajantila et al, 1991; Baechtel et al, 1993; Kloosterman et al, 1993).

Evaluación de microsatélites

Cada unidad de repetición de los microsatélites posee entre 2 y 5 nucleótidos, por lo cual se requiere la amplificación por PCR y evaluación posterior mediante geles de poliacrilamida (PAGE), similares a los empleados en secuenciación de ADN, que permiten discriminar diferencias de longitud de sólo un nucleótido.

Estas pequeñas secuencias presentan un número variable de repeticiones en tándem (STRs o short tandem repeats), desarrollándose los primers³⁰ necesarios para su amplificación. Edwards et al (1991) describen 10 sistemas distintos, localizados en los cromosomas 1, 4, 6, 7, 11, 12 y X, que involucran secuencias repetidas de 3 ó 4 bases. Desde entonces, se incorporaron un número creciente de microsatélites (Kimpton et al, 1992; Polymeropoulos et al, 1992; Wiegand et al, 1993; Hammond et al, 1994). (Figura 3).

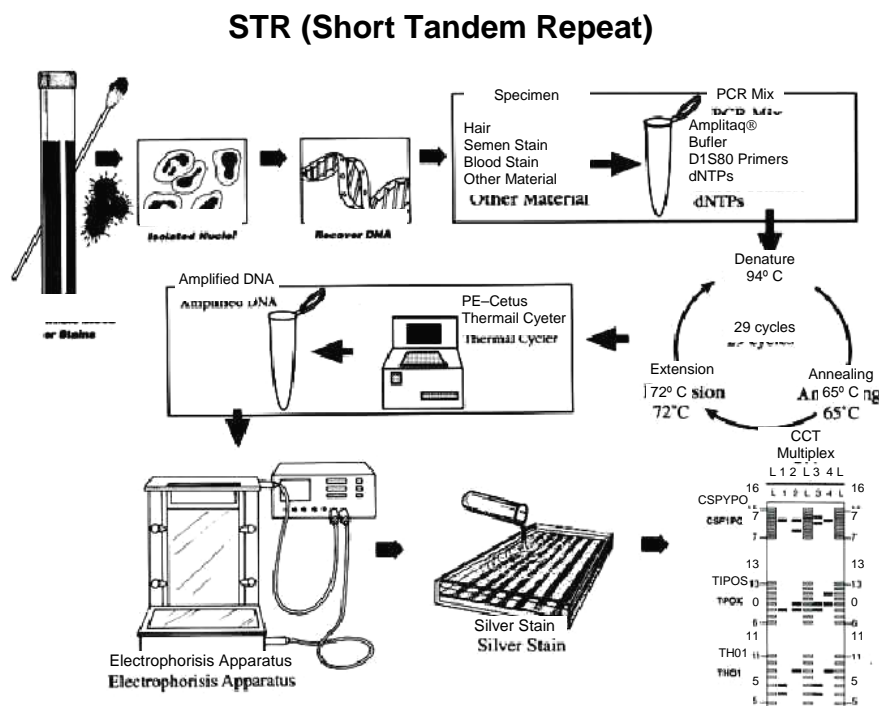


FIGURA 3.

Sistemas basados en diferencias en las secuencias nucleotídicas

Variantes génicas nucleares

El primero y más difundido análisis con aplicación forense, es el que estudia una región localizada en el segundo exón del gen HLA-DQ-a del complejo mayor de histocompatibilidad (HMC). La corporación Cetus (USA) desarrolló un sistema que permite detectar, de esta región polimórfica, seis alelos diferentes, denominados 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3 y 4, por lo cual existen 21 genotipos distintos en la población general (Higuchi et al, 1988; Saiki et al, 1989; Amplitype User Guide, 1990; Comey et al, 1993).

Posteriormente, Cetus Corp. implementó un sistema denominado "Polymarker", que incluye, además del mencionado HLA-DQ-a otros cinco loci variables: LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, y Gc. Cada uno de ellos presenta dos o tres alelos diferentes en la población general (Budowle, 1994).

Variantes de ADN mitocondrial

Dentro de los sistemas cuya variación reside en la secuencia de nucleótidos, merece especial atención el estudio del ADN presente en las mitocondrias. En el año 1981, Anderson y col. publican la secuencia completa del genoma mitocondrial (Anderson et al., 1981), de aproximadamente 16,5 Kb, que presenta una región no codificante, denominada *D loop*, donde se encuentra el origen de replicación, y que se caracteriza por presentar sitios con elevado índice de mutación.

Debido a que la información contenida en la secuencia mitocondrial⁴⁶ es heredada a partir de la vía materna exclusivamente esto permite establecer vínculo de parentesco entre individuos maternalmente relacionados (Giles et al, 1980) El

análisis de la secuencia permite diferenciar un individuo de otro de distinto linaje materno (Higuchi et al, 1988).

Esta característica, sumada a que cada célula contiene una gran cantidad de mitocondrias y por ello el genoma mitocondrial se halla mucho más representado que el contenido en el núcleo celular, hace que este sistema sea de suma utilidad, principalmente en los casos de material ampliamente degradado.

A partir del análisis de esta secuencia han sido caracterizados restos arqueológicos de varios miles de años de antigüedad, en los que fue factible obtener ADN mitocondrial relativamente bien conservado (Paabo, 1990).

Evolución metodológica y perspectivas

A partir de 1990, los análisis mediante PCR⁶⁵ fueron ganando espacio en los laboratorios forenses, debido a la relativa simplicidad de sus técnicas, menor costo e interpretación sencilla de los resultados, pero por sobre todo por requerir ínfimas cantidades de ADN: actualmente, es posible partir de tan sólo un nanogramo para analizar cada uno de los sistemas variables.

En algunas muestras tales como pequeñas manchas de sangre o semen, saliva, pelos o cadáveres antiguos, constituye la única posibilidad de lograr una caracterización genética (Hagelberg et al, 1991; Jung et al, 1991; Comey et al, 1991, 1993; Blake et al, 1992; Uchihi et al, 1992; Walsh et al, 1992).

En nuestro país, el Servicio de Huellas Digitales Genéticas se hace cargo hacia fines de 1991, de los análisis judiciales que involucran estudios de ADN, fijando criterios de estandarización internacionalmente aceptados y estrategias de recolección y análisis de muestras forenses (Corach et al, 1993a; Penacino y Corach, 1993b).

Las muestras de interés forense a ser amplificadas mediante PCR requirieron tratamientos especiales en cuanto a la extracción y purificación del ADN, que fue encarado por varios equipos de investigación, lográndose métodos eficientes a partir de ínfimas cantidades de material (unos 3 microlitros de sangre) (Chelex protocols, 1990; Corach, 1991; Jung et al, 1991)⁶⁸.

El desarrollo reciente de un método alternativo que utiliza bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) permite extraer ADN de huesos, dientes, piel y músculos humanos, con una notable reducción de contaminantes que dificultarían el análisis posterior (Corach et al, 1994a). Esta situación representa una gran ventaja respecto a los métodos tradicionales que emplean combinaciones de enzimas proteolíticas (proteínasa K, pronasa, etc.), y agentes caotrópicos (lauril sulfato de sodio, etc.).

Así, sintetizando la breve historia de la metodología empleada por la Biología Molecular Forense desde sus inicios, podemos observar cómo los análisis mediante sondas *multilocus* fueron reemplazados por las sondas de *locus único*, en caso de poder obtenerse ADN suficiente (alrededor de 200 nanogramos); y por sistemas de análisis basados en PCR si el ADN se encuentra en menor cantidad, ambos sistemas altamente reproducibles y de fácil interpretación (Hochmeister et al, 1991; Mangin et al, 1991; Mulhare et al, 1991).

Otra modificación de las técnicas tradicionales consiste en el paulatino abandono de los métodos que emplean isótopos radiactivos, que son reemplazados con eficiencia similar por sistemas quimioluminiscentes (Sheffield et al, 1992; FBI, 1993)⁴⁷.

El desarrollo, validación y aplicación de nuevos sistemas a nivel mundial se ve reflejado en su incorporación en nuestro medio, en el Laboratorio del Servicio de Huellas Digitales Genéticas.

Controles de Calidad

Ante el empleo de *primers* y sondas semejantes en todo el mundo, validadas para uso forense, se han encarado actualmente sistemas de control de calidad en Europa (a través de la EDNAP -European DNA Profiling-) y EEUU (mediante el TWGDAM -Technical Working Group on DNA Analysis Methods-) con el objeto de unificar criterios y evitar errores de interpretación (Schneider et al, 1991; Hicks et al, 1991).

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Las técnicas y métodos que se reportan en este trabajo son algunas de las más utilizadas actualmente, cada una delimitada por su importancia, fundamento o economía. Constituyen una base de investigación para el análisis de semen con la limitante de que sus resultados son sólo una parte de un gran conjunto de pruebas y estimaciones que no hacen culpable a una persona o la excluye de serlo sin embargo conducen a la identificación individual. Los resultados aumentan su importancia cuando se llega a la identificación de un presunto responsable ya que a través de estos métodos una investigación lleva a tener una dirección que probablemente conduzca a la aplicación de la justicia cuando hay un culpable.

Estos métodos son la base de la investigación que se ve completada con resultados de otras áreas forenses que también participan en la investigación, cabe mencionar que los resultados de genética son los que más nos conducen al retrato biológico del delincuente; pero sin restar importancia al resto de las técnicas aplicadas pues son las que nos marcan el inicio de la investigación como puede ser una prueba de orientación, tal es el caso de la fosfatasa ácida que no ha perdido popularidad en su empleo a pesar de no ser una reacción específica del semen.

Conforme avanzan los conocimientos las técnicas se modernizan y se sustituyen unas por otras, por ejemplo: las técnicas cristalográficas han resultado ser poco prácticas y específicas por lo cual ya no se utilizan.

El empleo de la lámpara de Wood como prueba de orientación ha demostrado gran utilidad en la investigación de campo, por lo cual su empleo seguirá siendo de gran utilidad.

La prueba de certeza para demostrar la existencia de semen es la presencia de células espermáticas, lo cual no sería posible de corroborar sin las técnicas de

tinción de las cuales la más importante para el laboratorio forense es Christmas Tree que es relativamente sencilla y define la observación de los espermatozoides.

El diagnóstico individual y de especie tiene un valor mayor de exclusión que de inclusión mediante la utilización de la determinación de grupo del sistema ABO en manchas de semen, por lo cual no puede asegurarse la participación de un individuo en un delito.

La genética ha venido a revolucionar los procesos judiciales a partir de 1980 cuando se empiezan a solicitar por parte de jueces métodos y técnicas de este tipo, lo cual tiene la finalidad y la identificación de personas con gran seguridad y fiabilidad en los resultados, pero aún falta la normatividad adecuada y la conciencia para su aplicación en nuestro país hace falta más que conciencia. . . hace falta preparación profesional en muchos ámbitos.

Las herramientas con las que un químico cuenta para la realización de su trabajo en general son adecuadas, pero existen condiciones que están fuera de su control como son: el estado en que las muestras llegan al laboratorio, el costo del equipo y reactivos empleados, la disposición de nuevas tecnologías que muchas veces no están al alcance aunque se conozcan.

Considero que es importante la búsqueda de información y la implementación o adaptación de nuevos métodos para el mejoramiento en el desarrollo de nuestro trabajo para sustentar la calidad científica por lo que a los químicos compete.

La relación sexual es uno de los delitos en nuestro país que más controversia causan al aplicar la justicia por el extenso campo en el cual hay que investigar una demanda de la sociedad es que cada quien aporte con un buen trabajo de investigación la aplicación de la justicia. El quehacer científico debe ser apoyado por investigaciones bibliográficas como la que se realizó en el presente trabajo.

ANEXOS



1. Reacción de florence
2. Reacción de barberio
3. Reacción de guarino
4. Fluorescencia
5. Técnica de la fosfatasa ácida
6. Técnica por inhibición de la fosfatasa ácida seminal y vaginal, con ácido L-tátrico
7. Determinación cuantitativa de la fosfatasa ácida prostática en huellas y manchas de semen
8. Tinción de Gramm
9. Técnica con Azul de Metileno
10. Técnicas de Christmas Tree
11. Técnica de Papanicolao
12. Secretores Sistema ABO
13. Técnica de tinción de Giemsa para espermatozoides
14. Técnica de Eosina sola
15. Técnica de Eosina-Nigrosina (modificación de la técnica de Blom)
16. Uso del DNA
17. Extracción diferencial de DNA a partir de muestras combinadas (semen-sangre; semen-células de descamación)
18. Extracción orgánica y separación de DNA de células espermáticas y células vaginales
19. Extracción diferencial de DNA espermático
20. Purificación con fenol/cloroformo
21. Recuperación del DNA
22. Técnicas de extracción orgánica
23. Técnicas de extracción inorgánica
24. Técnica de extracción por medio de kits comerciales
25. RFLP's fragmentos de restricción de longitud polimórfica
26. PCR
27. STRs Short Tandem Repeats

En el Laboratorio de Química Forense una herramienta esencial es la consulta de métodos y técnicas establecidas que hayan sido usadas tal vez con otros fines pero que sirva en el análisis forense por sencillas, de valor científico y útiles para el análisis de semen por lo cual se anexan algunos detalles de los métodos mencionados en el presente trabajo para su consulta rápida.

1. REACCIÓN DE FLORENCE

Utiliza solución yodo–yodurada y obtiene cristales de colina (rombos color castaño)⁷², consiste en la formación de cristales bajo la acción del siguiente reactivo: yoduro de potasio 1.65, yodo 2.54, agua destilada 30 c.c. Se coloca en un portaobjetos una gota del macerado sospechoso y se le agregan dos gotas de reactivo, cubriendo la preparación para examinarla al microscopio; si hay esperma, se forman los cristales.

2. REACCIÓN DE BARBERIO

Reactivo: solución saturada de ácido pícrico. Para efectuar esta reacción se procede como en la de Florence: una gota del líquido a examinar y dos del reactivo de Barberio, se colocan sobre un portaobjetos, obteniendo cristales en forma de agujas, conos los que están adosados por su base y presentan por su transparencia un aspecto romboide, cuyos ángulos obtusos serían truncados; a veces son ovoides y entre éstos y los rómbico se observan todos los intermediarios⁶¹.

3. REACCIÓN DE GUARINO

Utiliza trinitro–resorcina, obtiene cristales de espermina (en “esqueleto de ramas de pino”), de color amarillo verdoso⁷².

4. FLUORESCENCIA

Se usa la luz de Wood o la de Gallois con filtro de cuarzo con óxido de níquel y longitud de onda alrededor de 3,650 Å (380 – 470 nm) y la mancha, en cuarto oscuro, toma una fluorescencia blanco–verdosa sin poder evitar las dudas sobre pus, orina y mucus, pero diferenciables en la fotografía⁸⁷.

Las prendas sospechosas deben ser examinadas a la luz ultravioleta de Wood¹⁴. Las manchas de esperma dan una fluorescencia blanca–amarillenta, que va ganando amarillo con el tiempo. El examen de fluorescencia permite diferenciarlas de las manchas debidas a otros productos, como orina (fluorescencia celeste), pus, moco o secreción vaginal. Sin embargo, la fluorescencia, a la lámpara de Wood no es específica del esperma también la encontramos en flujo vaginal producido por hongos o bacterias y detergentes biológicos entre otros.

La fluorescencia puede estar ausente si la mancha ha sido tratada con detergente. La actividad de las flavinas decrece con el tiempo aproximadamente 50% cada 24 horas de tal forma que después de 36 horas se observara aproximadamente el 25% de la fluorescencia inicial⁵⁹. En conjunto se trata de una prueba de gran valor de orientación y localización³³.

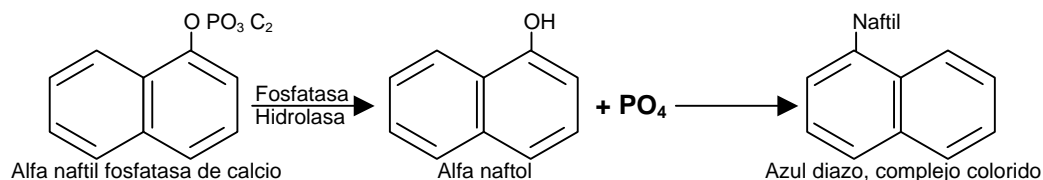
5. TÉCNICA DE LA FOSFATASA ÁCIDA

Fundamento Químico

La Fosfatasa ácida, ACP, monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa (pH óptimo: ácido). Peso molecular: 100,000 daltons (varía con la fuente tisular). Clase química: enzima, glucoproteína. Se han descrito 20 isoenzimas diferentes, la de mayor importancia es la prostática (PAP, isoenzima 2 por electroforesis)⁵⁰.

La fosfatasa ácida del esperma reacciona con el reactivo 1–naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; éste reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso.

Reacción química de la técnica para detección de fosfatasa ácida²⁸



| Valores de referencia ⁴ = ng / mL y unidades | |
|---|--|
| Ácida prostática | Normal: 0.60 – 1.0 ng/ml |
| Ácida prostática | Normal Unidades Internacionales: < 4 mU/MI |
| Ácida total | Normal: 0.5 – 5.0 Unidades King–Armstrong |
| Ácida total | Normal: < de 1.5 Unidades Bodanski |
| Ácida total | Normal Unidades Internacionales: <11 mU/mL |

Preparación de Reactivos**Solución 1 (Buffer)**

| | |
|---|---------|
| Cloruro de sodio | 23.0 gr |
| Acetato de sodio 3 H ₂ O | 2.0 gr |
| Ácido Acético Glacial | 0.5 ml |
| Agua Destilada | 90.0 ml |

Solución 2

| | |
|---|---------|
| 1-naftil fosfato de calcio | 50.0 gr |
| Sulfato de dianisiltetrasonio | 30.0 gr |
| Solución acuosa al 10% de lauril | |
| Sulfato de sodio | 1.0 ml |

Reunir las soluciones 1) y 2); filtrar y envasar en frasco ámbar que se guarda en refrigeración a 4° C. Esta solución se conserva activa durante un año.

En virtud de que actualmente ya no se fabrica el sulfato de dianisiltetrasonio, se ha sustituido por el siguiente reactivo:

Solución 1

| | |
|--|--------|
| Orto Dianisidina tetrazotizada | 1 gr |
| Acetatodesodio | 20 gr |
| Ácido acético | 10 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

Solución 2

| | |
|--|--------|
| Alfa naftil fosfato de sodio | 0.8 gr |
| Agua destilada | 10 ml |

Mezclar 10 ml de Solución 1, 89 ml de agua destilada y 1.0 ml de la Solución 2. Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

Procedimiento

La mancha problema o el hisopo con el cual se tomó la muestra, se colocan entre dos hojas de papel filtro; lo mismo se hace con material igual no manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como testigo positivo.

Se colocan sobre una lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: Testigo negativo; Muestra problema y Testigo positivo; inmediatamente después se agregan aproximadamente 10 gotas de reactivo a cada una de las muestras, con una pipeta Pasteur.

Interpretación de los resultados⁵⁹

La aparición de una coloración violeta intensa en la muestra problema dentro de un tiempo no mayor a 5 minutos, indicará la presencia de fosfatasa ácida en cantidades mayores a 20 Unidades King–Armstrong y por lo tanto la muy probable presencia de semen, en el testigo positivo siempre deberá observarse la intensidad de color arriba señalado, tonalidad que no deberá aparecer en el testigo negativo.

6. TÉCNICA POR INHIBICIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA SEMINAL Y VAGINAL, CON ÁCIDO L–TARTÁRICO⁴³

Preparación de los reactivos⁵

Solución 1 (Buffer de acetatos)

| | |
|---------------------------------|---------|
| Cloruro de sodio | 23.0 gr |
| Acetato de sodio | 2.0 gr |
| Ácido Acético Glacial | 0.5 ml |
| Agua Desionizada | 90.0 ml |

Disolver perfectamente los reactivos en agua; ajustar el pH a 4.9 y el volumen final a 100 ml con agua desionizada. Envasar en frasco ámbar y guardar en refrigeración.

Solución 2 (sustrato)

| | |
|--|---------|
| Alfa naftil fosfato, sal de calcio . . | 0.30 gr |
|--|---------|

Colocar los 0.30 gr del reactivo anterior en un frasco gotero color ámbar de 30 ml de capacidad; añadir 20 ml de la Solución 1 (buffer de acetatos), agitar hasta disolución y almacenar en refrigeración, esta solución debe prepararse cada mes, por lo que es conveniente anotar en la etiqueta del frasco la fecha de preparación.

Solución 3 (colorida)

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Naftil–diazó azul B. | 0.3 gr |
| Solución salina estéril | 20.0 ml |

Envasar en frasco gotero ámbar. Conservarla en refrigeración y anotar en su etiqueta la fecha de preparación, ya que debe renovarse cada dos meses.

Solución (inhibidor)

| | |
|----------------------------------|----------|
| Ácido L–tartárico | 3.0 gr |
| Hidróxido de sodio 1 N | 35.0 ml |
| Agua desionizada | 200.0 ml |

Disolver el ácido L–tartárico en un poco de agua y agregar los 35 ml de hidróxido de sodio 1N; agitar hasta disolución. Ajustar el pH a 4.9, agregando hidróxido de sodio 1N si el pH es demasiado bajo y ácido L–tartárico si está algo; añadir agua desionizada hasta aforar el volumen a 200 ml.

Almacenar en frasco ámbar en refrigeración, anotando en la etiqueta la fecha de preparación. Esta solución deberá renovarse cada dos meses.

Procedimiento

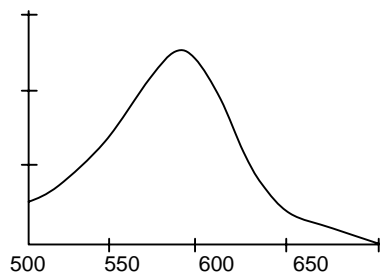
1. Cortar un trozo de 1 x 1 cm del material que contenga la mancha seminal sospechosa; colocarla en un tubo de ensayo con tapón de rosca, de 15 ml de capacidad y añadir 3.0 ml de agua desionizada. Marcar el tubo con la palabra “Problema”.
2. Cortar un trozo de 1 x 1 cm de un área que no presente manchas, colocarlo en un tubo igual al de la muestra problema con 3.0 ml de agua. Marcar el tubo “Control”.
3. Después de 15 minutos preparar 4 tubos de 7 ml como sigue:
“P” de problema con 3 gotas de sustrato
“Pi” problema inhibidor con 3 gotas de sustrato y 3 gotas de inhibidor
“C” de control con 3 gotas de sustrato
“Ci” control inhibidor con 3 gotas de sustrato y 3 gotas de inhibidor.
Agitar cada tubo mezclando bien.
4. Poner 0.3 ml (aproximadamente 10 gotas) del tubo “Problema” a cada uno de los tubos P y Pi. Mezclar.
5. Pasar 0.3 ml del tubo “Control” a los tubos marcados: C y Ci. Mezclar.
6. Agregar tres gotas de la solución de naftil–diazó azul B, a cada uno de los cuatro tubos.

Interpretación

Si el tubo marcador como P cambia de color café marrón a violeta intenso en 30 segundos o menos, mientras que el Pi en el mismo tiempo toma un color amarillo pálido el resultado es positivo. Los tubos C y Ci deben también permanecer de color amarillo claro; si esto no sucede indicará que el reactivo se ha deteriorado; así pues, si el tubo problema cambia a color violeta intenso y este color no aparece en ninguno de los otros tres tubos, el resultado será indudablemente positivo. En ausencia de espermatozoides, esta técnica debe ser corroborada por electroforesis usando suero de semen antihumano para comprobación; siendo además conveniente cuantificar la fosfatasa ácida especialmente cuando se trata de individuos azoospermicos o vasectomizados²⁸.

7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA FOSFATASA ÁCIDA PROSTÁTICA EN HUELLAS Y MANCHAS DE SEMEN⁴³

La coloración azul es proporcional a la cantidad de enzima prostática y se mide en un espectrofotómetro para inmunoensayo enzimático a 590 nm: la lectura se compara con una curva de calibración previamente elaborada para ese efecto. El instrumento utilizado es un espectrofotómetro ultravioleta visible para inmunoensayo enzimático.



Curva de absorción del color en la determinación de fosfatasa ácida: patrón de timolftaleina (21.5 microgramos) frente a agua.

Las muestras obtenidas de la toma del exudado vaginal, anal y/o de la tela manchada, se suspenden en un mililitro de solución salina estéril y se conservan en refrigeración entre dos y ocho grados centígrados hasta su procesamiento, que debe ser inmediato.

Reactivos

1. Reactivo concentrado de fosfatasa ácida (2.6 milimoles de monofosfato timolftaleina sódica, con buffer y estabilizador).
2. Diluyente de fosfatasa ácida (50 milimoles de ácido acético).
3. Desarrollador de color (100 milimoles de hidróxido de sodio, más 100 milimoles de carbonato de sodio).

4. Calibrador de fosfatasa ácida (0.3 milimoles de timolftaleína con estabilizador igual a 10 unidades por litro de actividad enzimática).
5. Preservativo específico para fosfatasa ácida (5.0 milimoles de buffer de acetato pH = 5).

En virtud de que se desarrolla este procedimiento con la técnica propuesta para fosfatasa ácida en suero por "Eagle Diagnostics", los reactivos que quedaron descritos se adquieren ya preparados para su uso por los Laboratorios Eagle.

Procedimiento

1. Colocar 0.5 ml del reactivo concentrado de fosfatasa ácida dentro de tubos rotulados: blanco, calibrador, control y muestra.
2. Añadir 0.5 ml de fosfatasa ácida diluida a cada tubo y mezclar bien.
3. Incubar los tubos a 37 grados centígrados aproximadamente 5 minutos.
4. Adicionar 0.1 ml de: blanco, calibrador, control y muestra a sus respectivos tubos simultáneamente o bien a intervalos controlados con cronómetro de un minuto (la incubación en el siguiente paso debe ser de exactamente 30 minutos para todos y cada uno de los tubos): mezclar suavemente. Usar agua desionizada para el blanco.
5. Incubar exactamente durante 30 minutos a 37 °C.
6. Siguiendo la misma secuencia del paso 4, añadir 1.0 ml del desarrollador de color y mezclar bien.
7. Ajustar el instrumento al cero de absorbancia y longitud de onda de 590 nm usando para ello el tubo asignado como blanco.
8. Leer los valores de absorbancia para el calibrador, control y muestra o muestras problema.
9. Interpolar con la curva de calibración.

Curva de calibración

Se efectúa con el calibrador de fosfatasa ácida, del equipo de reactivos, que contiene 300 micromoles de timolftaleína por litro y que se traduce en 10 unidades por litro de fosfatasa ácida al incubar durante 30 minutos a 37°C.

La linealidad del instrumento en estas condiciones se extiende hasta 100 unidades por litro; si la lectura excede la linealidad de la curva, efectuar diluciones de la muestra para que se cumpla la Ley de Beer y de Lambert.

Si no se tiene la curva utilizar la siguiente ecuación²⁸:

$$U/L = (\text{Abs. Muestra P} / \text{Abs. Calibrador}) \times \text{Conc. Cal.}$$

en donde:

U/L = Concentración en Unidades por Litro.

Abs. Muestra P = Lectura en absorbancia de la muestra problema.

Abs. Calibrador = Lectura en absorbancia del calibrador.

Conc. Cal. = Concentración del calibrador en unidades por litro.

8. TINCIÓN DE GRAMM^{5, 15}

Reactivos

1. Colorante de crystal violeta

Solución A

| | |
|------------------------------------|-------|
| Cristal violeta. | 2 gr |
| Alcohol etílico absoluto | 20 ml |

Solución B

| | |
|-----------------------------|--------|
| Oxalato de amonio | 0.8 gr |
| Agua destilada | 80 ml |

Mezclar las soluciones A y B. envasar en frasco gotero color ámbar.

2. Solución yodo iodurada (Lugol)

| | |
|-----------------------------|--------|
| Iodo metálico | 1 gr |
| Yoduro de Potasio | 2 gr |
| Agua destilada | 300 ml |

Diluir 1:15 en agua destilada antes de usarla.

3. Decolorante

Alcohol etílico absoluto (95%)

4. Colorante de safranina

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Safranina (2.5% en alcohol etílico) . | 10 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

Procedimiento

El frotis o una gota de suspensión problema, se secan ligeramente al calor del mechero o bien se fijan con metanol.

- a) Añadir el reactivo de cristal violeta hasta cubrir la muestra y dejarlo actuar durante 1 minuto.
- b) Lavar con agua destilada.
- c) Cubrir nuevamente el portaobjeto con la solución 2 durante 1 minuto; tirar el exceso de lugol y decolorar con agitación utilizando el reactivo número 3 durante 30 segundos.
- d) Secar con papel filtro y cubrir la preparación con el reactivo asignado con el número 4; dejarlo actuar de 10 a 30 segundos.
- e) Lavar con agua destilada y observar al microscopio con aceite de inmersión y el objetivo correspondiente.

Interpretación

Las células espermáticas aparecerán teñidas: la cabeza de color rosa y el resto del cuerpo y cola azules.

9. TÉCNICA CON AZUL DE METILENO^{84, 67}

Colorante de azul de metileno:

| | |
|------------------------------------|--------|
| Azul de metileno | 1 gr |
| Alcohol etílico absoluto (95%) . . | 30 ml |
| Agua destilada | 100 ml |
| Acético glacial | 5 ml |

Disolver el azul de metileno en el etanol, añadir el ácido acético y el agua destilada.

Procedimiento

Fijar el frotis que contiene la muestra problema por medio de calor como en el caso anterior.

- a) Cubrir la preparación con el colorante de azul de metileno.
- b) Dejarlo actuar durante un minuto.
- c) Retirar el colorante y lavar con agua.
- d) Observar al microscopio con aceite de inmersión, e igual objetivo.

Interpretación

Los espermatozoides se observarán coloreados tanto la cabeza como cuerpo y cola de color azul.

10. TÉCNICAS DE CHRISMAS TREE^{70, 15}

Colorante Rojo rápido nuclear:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Rojo rápido nuclear | 50 mg |
| Sulfato de aluminio | 2.5 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

- Calentar a ebullición, los 100 ml de agua destilada y disolver en ellos el sulfato de aluminio; adicionar el colorante rojo rápido nuclear; mezclar con el agitador mecánico, hasta disolución completa.
- Enfriar y filtrar en papel Wathman No. 1.
- Almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 y 8°C.

Colorante de Índigo Carmín

| | |
|--------------------------|---------|
| Ácido pícrico | 1.3 gr |
| Índigo Carmín | 0.23 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

- Disolver el ácido pícrico en los 100 ml de agua.
- Añadir los 0.3 gramos de índigo carmín.
- Mezclar perfectamente con agitador mecánico.
- Guardar en frasco gotero ámbar.

Procedimiento

- a) Una vez fijado el frotis, añadir dos gotas de rojo rápido nuclear y dejarlo reposar en cámara húmeda durante 15 minutos (puede utilizarse una caja de Petri, colocando en la base y el interior de la tapa, un papel filtro húmedo).
- b) Lavar con agua desionizada, durante 5 segundos, añadir una gota de colorante número 2 y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos.
- c) Lavar con etanol absoluto para decolorar, secar por 5 minutos.

Interpretación

Al observar al microscopio, el núcleo del espermatozoide, aparecen en color rojo. El acrosoma y la cola, de color verde.

Colorante Rojo rápido nuclear:

| | |
|-------------------------------|--------|
| Rojo rápido nuclear | 50 mg |
| Sulfato de aluminio | 2.5 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

- Calentar a ebullición, los 100 ml de agua destilada y disolver en ellos el sulfato de aluminio; adicionar el colorante rojo rápido nuclear; mezclar con el agitador mecánico, hasta disolución completa.
- Enfriar y filtrar en papel Wathman No. 1.
- Almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 y 8°C.

Colorante de Índigo Carmín

| | |
|--------------------------|---------|
| Ácido pícrico | 1.3 gr |
| Índigo Carmín | 0.23 gr |
| Agua destilada | 100 ml |

- Disolver el ácido pícrico en los 100 ml de agua.
- Añadir los 0.3 gramos de índigo carmín.
- Mezclar perfectamente con agitador mecánico.
- Guardar en frasco gotero ámbar.

11. TÉCNICA DE PAPANICOLAOU^{67, 4}

El método de coloración:

a) Hematoxilina de Harris

| | |
|---|----------|
| Hematoxilina | 1.0 g |
| Alcohol absoluto | 10.0 ml |
| Sulfato de aluminio y potasio | 20.0 g |
| Agua destilada | 200.0 ml |
| Oxido rojo de mercurio | 0.5 g |

Disolver en un matraz la hematoxilina en el alcohol. En otro matraz con el agua caliente agregar el sulfato de aluminio y potasio (alumbre). Mezclar las dos soluciones, llevar a ebullición. Agregar el óxido rojo de mercurio lentamente y agitar hasta que la mezcla tome un color rojo púrpura oscuro y ya no aparezca óxido en la solución, retirar del fuego, dejar reposar y filtrar. El colorante se puede utilizar en cuanto se enfría. El detalle de la coloración nuclear es mejor cuando se agregan 2–4 ml de ácido acético glacial por 100 ml de la solución. Se emplea en el método regresivo, su duración es de dos años.

La hematoxilina no es un colorante, debe ser transformada en hemateína para que actúe como colorante nuclear. Para lograrlo, en la preparación de la solución de hematoxilina se utiliza: un oxidante, un mordente, un solvente y un ácido.

b) Color Orange G

| | |
|--|--------------------------|
| Solución de Anaranjado G al 1% | 1000.0 ml en alcohol 96° |
| Ácido fosfotúngstico | 0.015 g |

c) Colorante EA 36

| | |
|---|---------|
| Solución de Verde Luz amarillento al 0.1% en alcohol de 96° | 45.0 ml |
| Solución de Café de Bismarck al 0.5% en alcohol de 90° | 10.0 ml |
| Solución de Eosina Amarillenta al 0.5% en alcohol de 96° | 45.0 ml |
| Ácido Fosfotúngstico | 0.2 g |
| Solución acuosa saturada de carbonato de litio | 1 gota |

Mezclar todos los colorantes y reactivos.

d) Para preparar alcohol de 50° y 70°, se hacen diluciones a partir del alcohol de 96°.

Para hacer la coloración por el método de Papanicolaou todos los reactivos, colorantes y el agua se colocan en cajas de vidrio con tapa, diseñadas para hacer coloraciones histológicas. Los portaobjetos en los que se han hecho los frotis de las muestras, se colocan en canastillas de vidrio o de metal y en éstas se van pasando a través de las cajas antes mencionadas.

| PROCEDIMIENTO | REACTIVOS | TIEMPO EN MIN. |
|-------------------------------------|--|----------------|
| Fijación | Alcohol de 96° Spray | 15 |
| Eliminación del carbowax del spray | Alcohol de 96° | 1 |
| Hidratación | Alcohol de 70° Alcohol de 50° Agua destilada | 1 1 3 |
| Coloración nuclear | Hematoxilina | 1 |
| Eliminación del exceso de colorante | Agua destilada | 1 |
| Virar la hematoxilina | Agua de la llave | 6 |
| Lavar | Agua destilada | 3 |
| Deshidratar | Alcohol de 50° Alcohol de 70° Alcohol de 96° | 1 1 1 |
| Coloración citoplásmica | OG 6 | 6 |
| Eliminación del exceso de colorante | Alcohol de 96° | 1 |
| Coloración citoplásmica y nucleolar | EA | 6 |
| Eliminación del exceso de colorante | Alcohol de 96° | 1 |
| Deshidratación | Alcohol absoluto | 5 |
| Transparentación | Alcohol absoluto-xileno Xileno | 15 20 |
| Montaje | Resina sintética | |

Resultados: Núcleo: azul; citoplasma: azul, verde, rosa y naranja. Los frotis coloreados con el método de Papanicolaou se observan al microscopio óptico primero con el objetivo de 10X para evaluar la calidad del material y la coloración, así como para determinar los caracteres generales de dicho material, posteriormente, con el objetivo de 40X para precisar y evaluar los datos morfológicos que permitan hacer un diagnóstico. En ocasiones, es necesario hacer algunas observaciones con el objetivo de inmersión. Los espermatozoides se tiñen del colorante nuclear según la técnica⁸⁴.

12. SECRETORES SISTEMA ABO⁸⁹

*Preparación de los reactivos*⁵¹

1. Suero anti-A. Diluir 3.5 ml de antisuero con 450 ml de buffer salino, se deben utilizar sueros selectos.
2. Suero anti-B. Diluir 1.0 ml de suero con 450 ml. de buffer salino.

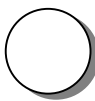
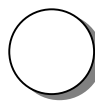
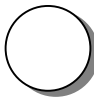
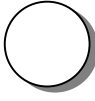
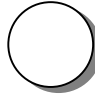
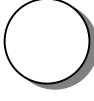

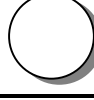

3. Anti-H lectina. Se utiliza como viene el producto comercial.
4. Buffer salino.
 - a) Na_2HPO_4 anhidro 1/15 molar (4.47 gramos por litro).
 - b) KH_2PO_4 anhidro 1./15 molar (9.09 gramos por litro).
5. Solución final:
72 ml de solución a), más 28 ml de la solución b), más 8.5 gramos de NaCl disueltos en 1,000 ml de agua destilada. En esta forma se obtendrá un pH de 7.2.

Preparación de las células testigo²⁸

Hacer suspensiones al 2% de eritrocitos de grupos conocidos O, A₁ y B, en buffer salino.

Preparación de las muestras

Fragmentos de tela de 1 x 1 mm, se impregnan con la muestra problema y con los testigos. Cada uno de los fragmentos se coloca en los tubos respectivos.

| | Problema | Control | Testigo |
|---------------|---|---|---|
| Anti-A |  |  |  |
| Anti-B |  |  |  |
| Anti-H |  |  |  |

Aplicación de la técnica

1. Colocar tres gotas de anti-A a la hilera de anti-A; tres gotas de anti-B en su hilera y tres gotas de anti-H en la hilera de anti-H.
2. Agitar vigorosamente.
3. Dejar que se efectúe la absorción durante toda la noche en refrigeración a 4 °C.

4. Centrifugar.
5. Remover el sobrenadante y colocarlo en una lámina hemoclasificadora.
6. Agregar una gota de suspensión de eritrocitos al 2% de A₁ en cada uno de los tubos de la hilera de anti-A; una gota de células B en la hilera de anti-B y del grupo O en la hilera de anti-H.
7. Agitar mecánicamente durante 10 a 12 minutos y esperar 9 minutos más.
8. Leer los resultados al microscopio.

Interpretación⁷²

1. Si se observa aglutinación con anti-A y con anti-B, pero no con anti-H, el grupo será O.
2. Si hay aglutinación en los tubos con anti-B y con anti-H, pero no en el de anti-A el grupo es A.
3. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B.
4. Si no existe aglutinación con anti-A ni con anti-B, pero si con anti-H el grupo es AB²⁸.

Es necesario aclarar que la determinación de esperma posee límites que no sólo dependen de la cantidad y calidad del material obtenido, sino también de la experiencia e idoneidad científica del que la realiza⁷².

13. TÉCNICA DE TINCIÓN DE GIEMSA PARA ESPERMATOZOIDES³⁴

- Fijar los frotis secados al aire, en metanol durante 5 minutos por lo menos.
- Dejar a temperatura ambiente para que sequen.
- Teñir en solución de colorante de Giemsa durante 30 minutos.
- Enjuague con tampón de fosfato pH 6.9.
- Dejar secar a temperatura ambiente y observar a microscopio a 40X.

14. TÉCNICA DE EOSINA SOLA³³

- Hacer un frotis de células espermáticas (a partir de hisopos de exudados vaginales, de semen, etc.) y fijarlo a 56 °C.
- Cubrir el frotis con el colorante Eosina Y al 0.5% y dejar por 5 minutos.
- Escurrir el colorante y enjuagar.
- Dejar secar y observar a microscopio a 40X.

15. TÉCNICA DE EOSINA–NIGROSINA (MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE BLOM)⁶⁷

- Colocar en un portaobjetos una gota de semen o de la muestra obtenida de hisopos con muestras positivas de líquido seminal procedentes de delitos sexuales, y añadir dos gotas de Eosina Y al 1% a los 30 segundos añadir tres gotas de Nigrosina al 10% (p/v) y mezclar.
- Hacer un extendido y secar al aire.
- Observar a microscopio a 40X⁶⁷.

16. USO DEL DNA

Contaminación biológica

Puede definirse como un aporte “extra” de material genético al propio de la evidencia. Este hecho origina, por tanto, una mezcla de material genético que puede crear cierta confusión en el análisis de las muestras y posterior interpretación de los resultados⁵⁹.

Degradación

Otro posible e importante problema es la degradación de las muestras. Cuando se habla de DNA degradado se hace referencia a un material genético que por acción, generalmente bacteriana, ha sido fragmentado de forma inespecífica por la actuación de nucleasas³¹.

Una de las importantes ventajas que aporta el PCR⁸¹ es la capacidad para poder amplificar material genético que se encuentra parcialmente degradado; no obstante cuando este nivel de degradación es muy elevado la amplificación de marcadores genéticos clásicos por la técnica de PCR⁸¹ es realmente complicado.

Existe otra serie de efectos que puede dañar el material genético. Así por ejemplo, la exposición de las muestras a los rayos ultravioleta durante un período de tiempo más o menos largo provoca daños sobre la estructura del DNA. Otro factor que puede dificultar enormemente el análisis es el efecto que ciertos conservantes pueden provocar sobre la cadena del DNA; es el caso del formaldehído, que siendo un importante conservante utilizado frecuentemente en la práctica histopatológica, es por otro lado un nefasto fijador de ácidos nucleicos. Esta mala fijación se traduce en limitadas extracciones de DNA, siendo mayor esta pérdida cuanto mayor sea el tiempo de exposición al conservante⁶⁰.

Por todo esto, conviene dar una serie de normas generales y particulares para las diferentes muestras que conviene cumplir si se pretende llevar a cabo un análisis de polimorfismo genético sobre muestras de origen biológico.

Normas generales sobre la recogida de evidencias biológicas

Hay requisitos básicos que garantizan la calidad de un análisis de los cuales se mencionan los siguientes:

1. Protección de la zona, en el lugar de hechos, impidiendo el paso a personas no autorizadas, ni calificadas en la recogida de indicios.
2. Utilización de material estéril, si es posible de un solo uso, cuando no es posible desechar el material (pinzas) se debe limpiar minuciosamente antes de recoger otra muestra. El uso de guantes durante todo el proceso, cambiándolos entre muestra y muestra. Se recomienda el uso de mascarilla y gorros de quirófano.
3. Las muestras deben ser guardadas de forma individual en envoltorios que permitan su transpiración, absolutamente estériles y sin previa utilización con ningún otro fin. Introducir más de una muestra en el mismo recipiente puede ocasionar problemas de contaminación.
4. Cada una de las muestras que se envía al laboratorio debe estar perfectamente etiquetada e identificada, debiendo constar el tipo de muestra, el día de recogida, el número de referencia de la muestra y el juzgado que remite la evidencia.
5. El envío de las muestras se debe realizar manteniendo su refrigeración y utilizando el medio de transporte que resulte más rápido.
6. Sobre las muestras que requieran un análisis de DNA no se debe añadir nunca ningún tipo de conservante que pudiera perjudicar los procesos de extracción y/o amplificación del material genético.

Muestras procedentes de agresiones sexuales⁶⁸

1. Cuando se denuncia una agresión sexual, lo recomendable es realizar una muestra vaginal, anal o bucal mediante hisopos estériles y secos, que se guardarán en sus correspondientes fundas sin

la adición de ningún líquido conservante. Por otra parte, también es aconsejable la realización de un lavado vaginal, anal o bucal con aproximadamente 10 ml de suero fisiológico estéril.

2. En todos los casos se identificarán perfectamente las muestras y se remitirán refrigeradas por el medio más rápido.
3. En lo referente a las ropas que sean remitidas tanto de la víctima como del agresor, deben enviarse en envoltorios individuales y estériles que deben permitir la perfecta transpiración de las prendas. Señalar si las prendas están húmedas o mojadas se deben dejar secar a temperatura ambiente y, una vez secas, actuar como se ha descrito anteriormente.

Una de sus mayores ventajas es que ofrece la posibilidad de resolver las mezclas de semen con otros fluidos biológicos procedentes de la víctima (fluidos vaginales, sangre o saliva), gracias a un método de extracción conocido como "lisis diferencial", que se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergente y proteinasa K en ausencia de un agente reductor. En un primer paso la muestra se incuba en una disolución con SDS (Dodecil sulfato sódico 20%) y proteinasa K y produce la rotura de las células epiteliales, pero no de los espermatozoides, que pueden recuperarse por centrifugación. En el sobrenadante de esta primera digestión queda el DNA procedente de la víctima. El precipitado, que contiene los espermatozoides íntegros, tras varios lavados se incuba de nuevo en una solución con SDS y proteinasa K, añadiendo esta vez el agente reductor DTT (Ditiotreitól 1 M). Tras la digestión, esta segunda fracción contiene el DNA de los espermatozoides.

De esta forma se obtiene información procedente de la víctima y del agresor por separado, y a partir de este punto cada fracción seguirá un protocolo rutinario de aislamiento de DNA, ya sea con fenol-cloroformo, o Chelex. Si el método elegido es el Chelex, es posible que sean necesarios pasos adicionales de purificación para aumentar el rendimiento en la amplificación.

Aunque la extracción diferencial resuelve las mezclas de semen con otros fluidos, no es de utilidad cuando el esperma procede de un individuo azoospermico o vasectomizado. La cantidad potencial de DNA que puede recuperarse en este caso disminuye drásticamente. En 1 ml de eyaculado de un individuo espermico puede obtenerse aproximadamente 450 ng de DNA a partir de los espermatozoides, mientras que los otros elementos formes del semen (leucocitos y células epiteliales) contribuyen con 30 ng. Esto supone que el contenido en DNA del semen de un individuo azoospermico es solo un 6.3% del que se obtiene en un individuo espermico.

Sin estas refinadas técnicas de micromanipulación, el límite de detección en preparaciones experimentales es de 150 espermatozoides aproximadamente. Con respecto a la posible influencia

sobre el éxito en la amplificación de la técnica de tinción utilizada en el frotis, se han realizado estudios que demuestran que los reactivos usados para tinciones rutinarias de muestras de semen (tinción ginecológica, christmas tree, hematoxilina–eosina, Papanicolaou) no afectan a la posibilidad de extraer y amplificar DNA de estas preparaciones. Únicamente fracasan en la amplificación las tratadas con técnica de Baecchi (fucsina ácida y azul de metileno disueltos en HCl al 1%).

Recientemente, el estudio de evidencias en casos de agresión sexual, en particular aquellas que se presentan en cantidades trazas, se ha beneficiado mucho de la incorporación en las bacterias de tipificación de microsatélites específicos del cromosoma Y. Estos Y–STR incrementan notablemente el índice de éxito en la identificación del componente masculino en mezclas de fluidos biológicos hombre/mujer en los que la lisis diferencial es inútil o en aquellas en las que sea de alto riesgo su aplicación (muestras muy degradadas o con muy pocos espermatozoides). En el caso concreto de mezclas muy desproporcionadas, se ha comprobado que incluso grandes cantidades de DNA femenino no inhiben la amplificación de alelos ligados al cromosoma Y característica que les da ventaja sobre los sistemas autosómicos⁶¹.

Para cumplir con estas características debe seguirse la siguiente metodología:

1. Extraer el material genético de las muestras problema (sangre, semen, saliva, tejido blando, tejido óseo, manchas o de células epiteliales) impregnadas en algún soporte. En virtud de que el DNA no se encuentra totalmente solo en el núcleo de las células, se aplica una lisis diferencial de tipo iónico, al adicionarle un detergente, con la finalidad de ir lisando pared celular y diferencial de centrifugación; esta operación llamada “lavado” se va repitiendo para seguir degradando de manera diferencial iónica y centrifugación, hasta llegar al núcleo y después ir degradando a las proteínas provenientes del núcleo, hasta obtener el DNA de alto peso molecular y pureza, para no afectar el proceso de la PCR⁷⁹ (Reacción en cadena de la polimerasa). Para asegurarse de la pureza del DNA se efectúa un lavado con una solución de cloroformo impregnado con fenol, para eliminar algún resto de proteínas, se mezcla perfectamente en un mezclador tipo vórtex y se separa la fase acuosa, de la orgánica por medio de centrifugación. Se adiciona un volumen igual al de la fase acuosa, (que es la útil pues es donde va disuelto el DNA) de etanol absoluto frío el cual precipita al DNA. El etanol lo desplaza, ya que éste es más soluble en agua que el DNA.
2. Una vez extraído el material genético, se cualifica y cuantifica a través de electrofóresis horizontal, que consiste en preparar una gelatina de un grosor de 0.6 cm y con una superficie de 14 cm, de largo por 11 cm, de ancho. Esta gelatina se prepara con agarosa grado proteínas, con una concentración que va del 0.8 al 1.0%, concentración que permite desplazar el DNA, a través de los sitios activos de la agarosa. Se deja desplazar únicamente 1.5 cm, a partir del origen, pues si se deja correr más, no se puede cualificar si es o no de alto peso molecular, puesto que se lleva a

cabo un barrido en el que no se observa una sola banda. Una banda bien definida a esa distancia, asegura un DNA, de alto peso molecular.

Para cuantificar el DNA en la muestra, se puede proceder de dos formas: una de ellas se efectúa, preparando un gel de agarosa, en donde se colocan estándares de peso molecular conocido, de 50, 100, 250 y 300 ng (nanogramos por cada 10 microlitros μ L) y de acuerdo a la intensidad de la banda, se extrapolan con las bandas obtenidas de las muestras problema, determinando así la concentración del material genético.

Otra forma de cuantificar el DNA, se efectúa por espectroscopia de luz ultravioleta. Las absorbancias que lo caracterizan son de 260 y 280 obviamente en la región del ultravioleta, para determinar la pureza y la concentración del material genético.

3. Después de cuantificar, se toman en promedio de 2 a 8 nanogramos de DNA para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La PCR⁸¹ es un tipo de clonación, puesto que se trata de generar copias exactas de un fragmento específico, de algún oligonucleótido del genoma humano y de naturaleza polimórfica, esto es que tiene un alto índice de variabilidad y puede diferenciar a individuos muy parecidos.

La PCR⁸¹, consta de 30 ciclos en promedio y cada ciclo se obtiene a diferente temperatura. Las temperaturas dependen de los "primers" o cebadores; éstos se refieren a una secuencia de oligonucleótidos específica, que son, el o los moldes, que generan el fragmento que se quiere amplificar. La primera temperatura utilizada es de 90 °C, donde la doble hélice de DNA, se separa en dos hebras de DNA; rompiéndose los enlaces de hidrógeno generando dos cadenas de DNA. Después se somete a una temperatura de 60 °C momento en que los "primers" o cebadores, se pegan a cada fragmento de DNA y la última temperatura, se eleva a 70 °C, en donde la enzima Taq polimerasa, comienza a colocar, de acuerdo a la secuencia de los "primers", cada base púrica y piridímica, (se encuentran en la solución, como el dATP, dCTP, dTTP y dGTP), generando a partir de una doble hélice, 2 hélices de DNA; de dos se obtienen cuatro y así sucesivamente hasta completar en promedio, 30 ciclos, los que generan millones de secuencias en cuestión.

4. Al final de los ciclos programados, el producto amplificado es sometido a una temperatura final de 72 °C, por un período de tiempo de 7 minutos, con la finalidad, de asegurar la unión de las cadenas de DNA formadas. Los factores que pueden afectar la amplificación son; la pureza del DNA, la concentración del mismo y la temperatura de amplificación.

5. Al final de la reacción en cadena de la Polimerasa, se elabora un gel de agarosa grado PCR⁸¹ al 4% dependiendo de la muestra y para verificar la presencia de la misma, deberá aplicarse al gel, la llamada “escalera de peso molecular” para determinar con precisión los productos de PCR⁸¹.

Determinación del genotipo

- a) Por medio de tiras Dot–Blot, que utiliza unas tiras de nylon en donde se encuentran fijadas covalentemente los oligonucleótidos específicos, en forma de cadena simple polimórfica; posteriormente se les adiciona el complemento, mismo que se distinguirá en color, cuando se unan, formando así la doble hélice, que se identificará en forma de un color, generando un punto, que representa un alelo, dos alelos forman un genotipo.
- b) Efectuar una electrofóresis vertical, en gel de acrylamida, más sensible que la anterior. Los genotipos son de naturaleza alfanumérica, lo que significa que los podemos leer, unos en forma de números y otros en forma de letras. Para tal propósito, pero únicamente para la técnica de reverso de Dot–Blot, el DNA amplificado, se somete a una temperatura de 95°C durante 8 a 15 minutos, con la finalidad de separar la doble hélice amplificada, inmediatamente se toma un volumen de 20 microlitros de este material, precalentado, mismo que se colocará en tiras. La unión entre el oligonucleótido y el DNA problema, se llevará a cabo formando un complejo, que se formará de acuerdo a las características astringentes, pH y temperatura, de las soluciones, durante todos los pasos que se llevan a cabo al efectuar la técnica del reverso del Dot–Blot. En este caso, los alelos obtenidos, se correlacionan con los obtenidos de las muestras tanto del lugar de los hechos, como los del presunto responsable, alelos que deberán ser idénticos, si se trata de la misma persona.

Para determinar genotipos por medio de la electrofóresis vertical, obsérvese que ésta en la parte superior presenta pozos, en los que se aplica muestra equivalente al tamaño del pozo y se aplica también un marcador de referencia, que señale los alelos presentes en la muestra. De esta manera se obtiene un patrón de bandas, que debe ser igual al de la persona que se trata de identificar, si se obtiene algún alelo diferente se puede hacer la exclusión de una manera absoluta.

Los marcadores genéticos se emplean de acuerdo a su naturaleza polimórfica, utilizando los modelos matemáticos que indican, si el valor de heterocigocidad, es mayor que el de homocigocidad. De aquí, la enorme importancia de conocer la distribución de alelos y genotipos de la población en la que se investiga y de acuerdo a la genética poblacional de un banco de datos representativo, calcular la fiabilidad de la técnica²⁸.

17. EXTRACCIÓN DIFERENCIAL DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS COMBINADAS (SEMEN-SANGRE; SEMEN-CÉLULAS DE DESCAMACIÓN)⁷⁷

1. Colocar una porción de la mancha de 25 mm², en 1 ml de agua destilada, incubar a 37 °C durante 1 hora, agitando periódicamente mediante vórtex.
2. Retirar la tela con un tip o un palillo de dientes autoclavado y centrifugar a 13,000 rpm, recuperar el sobrenadante que tiene las células.
3. Digestión del material de la víctima con proteinasa K/ SDS/ TEC e incubación durante 2 horas a 56°C. La solución se prepara con: EDTA 10 Mm, Tris 10 mM, NaCl 100 mM, a ésta añadir SDS 1% y 10 a 20 µl de proteinasa K.
4. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante que contiene el DNA de la víctima.
5. El precipitado del paso anterior contiene los espermatozoides del agresor. Se resuspende nuevamente en pK / SDS / TEC.
6. Añadir 10 µL de DTT e incubar durante 12 horas a 56°C.
7. Luego con los dos líquidos se procede a las extracciones con solventes orgánicos (fenol / cloroformo-isoamílico) y precipitar el DNA de ambos en etanol absoluto.
8. En caso de tratarse sólo de muestras de semen no se realiza la separación del material de la víctima⁶⁸.

18. EXTRACCIÓN ORGÁNICA Y SEPARACIÓN DE DNA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS Y CÉLULAS VAGINALES^{86, 95}

1. Colocar la muestra problema con semen en un tubo de 1.5 ml (pedazo de hisopo de algodón, o tejido manchado cortado).
2. Añadir la Solución de Separación A (SSA).

| | |
|-----------|-------------------------|
| 400 µl de | Tris / EDTA / NaCl |
| 25 µl de | sarkosyl |
| 75 µl de | agua |
| 5 µl de | proteinasa K (20 mg/ml) |

3. Mezclar el contenido del tubo con agitación suave e incubar a 37 °C durante 2 horas.
4. Hacer un agujero en la tapa del tubo (liberar gases). Transferir el material dentro del tubo y centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm.
5. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo de 1.5 ml. Ésta es la fracción que contiene el DNA de las células lisadas (denominarla Fracción Femenina).
6. Retirar el substrato que queda y colocarlo en otro tubo. Ser cuidadoso de no tocar el pellet que queda en el fondo del tubo original.
7. Añadir al pellet (Fracción Masculina) en el tubo original la Solución de Separación B (SSB):

| | |
|-----------|-------------------------|
| 150 µl de | Tris / EDTA / NaCl |
| 50 µl de | sarkosyl al 20% |
| 40 µl de | DTT 0.39 M |
| 150 µl de | agua |
| 10 µl de | proteínasa K (20 mg/ml) |
8. Mezclar suavemente el contenido del tubo e incubar durante 2 horas a 37 °C.
9. Agregar al pellet 500 µl de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1); realice el paso dentro de una campana de extracción de gases.
10. Mezclar con vórtex durante 20 segundos hasta que la emulsión se vuelva «lechosa». Al final un Spin a gran velocidad durante 2 minutos en una microcentrífuga.
11. Se pueden realizar más extracciones orgánicas sucesivas para purificar la muestra, hasta un máximo de tres veces.
12. Retirar el estrato acuoso (Fracción Masculina) del tubo inicial y colocarlo en un nuevo Eppendorf de 1.5 ml. Tratar de no remover la capa proteica desnaturalizada que se formó en la interfase entre el agua y las capas orgánicas.
13. Añadir a la capa acuosa 10 ml de Etanol Absoluto a -20 °C.
14. Mezclar manualmente y colocar el tubo a -20 °C durante 30 minutos.
15. Centrifugar durante 15 minutos a 12,000 rpm.

16. Decantar y eliminar el alcohol.
17. Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente.
18. Centrifugar 5 minutos.
19. Decantar y eliminar el alcohol. Retire el alcohol remanente con una micropipeta.
20. Centrifugar nuevamente durante 30 minutos, luego retirar el alcohol remanente.
21. Resolubilizar el DNA en 36 μ l de TBE a 56 °C al menos 2 horas. Se puede dejar el DNA durante toda la noche a 56 °C.
22. El DNA sustraído pertenece a la Fracción Masculina.

19. EXTRACCIÓN DIFERENCIAL DE DNA ESPERMÁTICO^{56, 16}

Digestión del material contaminante⁶⁸

1. Colocar una porción de la mancha de 25 mm² con una Solución de Extracción, incubar a 37 °C durante 30 minutos, agitando periódicamente mediante vórtex.
2. Preparar la solución:
Tampón de Extracción + SDS al 2% + Proteinasa K 30 μ l (20 mg/ml)
3. Preparar el tampón con:

| | |
|----------------------|----------|
| Tris 0.01 M | 1.21 g/l |
| EDTA disódica 0.01 M | 3.72 g/l |
| NaCl 0.1 M | 5.84 g/l |
| SDS al 2% p/v, pH 8 | |
4. Preparar el tampón cada semana y guardarlo a temperatura ambiente.
5. Después de esta corta incubación, perforar el fondo del tubo con una aguja caliente y centrifugar la mezcla con un Saín corto. Todas las muestras deben estar en tubos Eppendorfs etiquetados. Asegurarse de perforar la tapa del tubo primero para prevenir que el contenido sea expulsado por el fondo del tubo por la presión ejercida por los gases.

6. Centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 14,000 rpm en una microcentrífuga.
7. Retirar el sobrenadante del extracto y lavar el pellet 3 veces en SDS / Tampón de Extracción. Luego centrifugar con un spin a 14,000 rpm. El sobrenadante contiene el material de la víctima, el pellet el DNA del sospechoso.
8. Tomar la precaución de guardar todos los tubos utilizados en una bolsa y congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede ser que se requiera nuevamente su uso ya que contienen residuos del material extraído.
9. Añadir la solución de extracción nuevamente al pellet, como se describió antes, e incubar toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. El pellet contiene el DNA del sospechoso.

20. PURIFICACIÓN CON FENOL / CLOROFORMO³⁸

Nota: Esta es la técnica estándar de extracción de DNA de sangre.

1. Retirar con una pinza estéril autoclavada los tejidos (ropa) u otros materiales que contenga el tubo. Se pueden utilizar palillos de dientes autoclavados para evitar contaminación.
2. Hacer un agujero en el fondo del tubo con aguja desechable caliente; hacer lo mismo con la tapa (con el objeto de liberar la acumulación de gases de la noche). Se puede perder una parte del extracto durante la perforación.
3. Numerar un segundo set de tubos Eppendorf. Colocar firmemente el tubo perforado dentro del nuevo tubo. Siempre adopte el procedimiento: perforar el tubo, colocarlo en el tubo receptor, colocar la pareja en la centrífuga y entonces centrifugar.
4. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
5. Colocar los tubos con el extracto en una gradilla. Tomar otra gradilla para colocar los tubos con fenol/cloroformo (F/C). Añadir $200\text{ }\mu\text{l}$ de solución de F/C a los tubos con el extracto, cierre cuidadosamente cada tubo. Mezclar con vórtex.
6. Se puede preparar de forma casera (in house) la solución de F/C o adquirir preparaciones comerciales listas. Se cita aquí como preparar la solución de fenol/cloroformo con:
Fenol sólido 500 g

| | |
|--------------------|--------|
| Cloroformo | 500 ml |
| Alcohol isoamílico | 20 ml |
| 8-Hdroxiquinolina | 0.5 g. |

Dejar toda la noche a temperatura ambiente para disolver. Añadir suficiente Tris/HCl 0.1 M (pH 8) hasta el filo del contenedor y agitar suavemente para equilibrar el fenol. Permitir que las capas se separen. Retirar la capa acuosa superior y descartar. Lavar dos veces más con Tris/HCl. Medir el pH del sobrenadante, debe estar entre 7.5 y 8.0. Si no es así continuar lavando hasta alcanzar el pH necesario.

7. Verificar que el contenido del extracto con la solución de F/C esté bien mezclado. Puede utilizar un agitador a velocidad máxima unos 30 minutos. Lo importante es obtener una emulsión de las capas acuosa/orgánico que facilitará la eliminación de proteínas contaminantes. Se pueden realizar agitaciones de forma manual con periodos de 30 segundos.
8. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 14,000 rpm. Retirar la capa acuosa superior y colocarla en otro tubo Eppendorf rotulado. Cuidar de no llevar el estrato orgánico.
9. En ocasiones, cuando la muestra en estudio proviene de escenarios muy contaminados, es difícil realizar el paso anterior porque la solución siguiente a la interfase es muy viscosa probablemente sean complejos proteicos de DNA. No descartar esta fase.
10. Se pueden realizar hasta 3 lavados con F/C, pero bastan 2 veces para encontrar una cantidad aceptable de producto. Considerar que con cada extracción hay una pérdida irre recuperable de DNA.

21. RECUPERACIÓN DEL DNA

1. Si existe alguna razón para creer que la cantidad de DNA es muy pequeña (entre 1 μ l y 10 pg/ml), agregar 1 μ l (20 μ l) de Glicógeno (Boheringer, Cat. 901393), por cada tubo Eppendorf que contenga un volumen aproximado de la muestra de 500 μ l. Mezclar con una pipeta suavemente.
2. Luego añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Congelar la mezcla y después seguir con el protocolo normal. Considerar que la recuperación del DNA por el glicógeno solo se logra en conjunto con la precipitación por etanol absoluto³⁸.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DNA

Proceso de las muestras:

1. Recepción de las muestras.
2. Manejo de muestra.
3. Extracción de DNA.
4. PCR⁷⁹ setup.
5. Tipificación del DNA.

Cada una de ellas se lleva a cabo en áreas físicamente separadas y en el orden en que se maneja la muestra.

1. Recepción y registro de muestra. Se decide si la muestra se recibe o no, de acuerdo a las condiciones de ésta, etiqueta, embalado, etc. Se registra en un libro de gobierno con todos los datos: número de averiguación previa, folio, etc.
2. Manejo de muestra. Elección de las muestras a manejar, fijación fotográfica, dosificación de la muestra y en el caso de ropas se recorta la zona.
3. Extracción de DNA. La extracción técnica depende del tipo de muestra y de la extracción que se realiza.
 - a) Técnica de extracción orgánica.
 - b) Técnica de extracción inorgánica.
 - c) Técnica de extracción mediante kits comerciales (orgánica e inorgánica).

22. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN ORGÁNICA

Utilizada para tejidos parcialmente degradados, huesos. Basada en una digestión proteica de membranas celulares y separación de DNA por gradiente de solubilidad, en una extracción líquido-líquido.

- En tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad se coloca 10 μ l o 0.1 g de muestra y 500 μ l de la mezcla de extractor/digestor boffer EDTA, proteinasa K, detergente SDS.
- Incubar de 2 a 24 horas, a 56 °C, moviendo constantemente, hasta que el tejido este en solución.

- Purificación. A 20 µl del DNA digerido se le agregan 400 µl de fenol–cloroformo–alcohol isoamílico en proporción 20:20:10. Mezclar para formar una suspensión.
- Centrifugar a 3,000 rpm por 3 minutos para separar las fases: superior acuosa que contiene el DNA, interfase proteica, inferior orgánica.
- Se separa la fase acuosa y se le adicionan 2 volúmenes de alcohol etílico. Mezclar. En esta fase ocurre la precipitación del DNA.
- Bajar la temperatura a 4° C y permitir la precipitación del DNA.
- Filtrar sobre papel y lavar con alcohol etílico al 70%.
- El DNA contenido en el papel filtro se resuspende en agua libre de nucleasas (por ej. Agua inyectable) o buffer. Esta se lleva a PCR⁸¹.

23. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN INORGÁNICA

Técnica Chelex⁶⁸. Se utiliza para muestras de saliva, sangre, semen, pelo. Generalmente esta basada en el uso de resinas quelantes, que contienen afinidad por iones metálicos y polivalentes, contienen grupos que actúan como grupos quelantes. El DNA se pega a la resina por carga específica del DNA (negativa).

1. Colocar 1 ml de agua libre de nucleasas estéril, en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Adicionar 10 microlitros de muestra al tubo.
3. Mezclar con vórtex durante 20 segundos.
4. Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos.
5. Centrifugar a 14,000 rpm a temperatura ambiente durante 3 min.
6. Eliminar el sobrenadante, con mucho cuidado para evitar eliminar el pelet, que podrá ser visible en el fondo del tubo.
7. Lavar el pelet con el agua de la solución de chelex, dos veces.
8. Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar el pelet.
9. Adicionar 200 microlitros de una solución de chelex al 5%, agitar suavemente.
10. Incubar la muestra a 56 °C durante 30 min.
11. Agitar el vórtex suavemente durante 5–10 seg.
12. Incubar la muestra en agua hirviendo durante 8 min. agitar suavemente en vórtex durante 5–10 seg.

13. Centrifugar la muestra a 14,000 rpm durante 3 min.
14. La muestra está lista para ser amplificada por PCR⁸¹.
15. Almacenar a 4 °C por periodos cortos o a -20 °C por largos periodos.

Nota: Las extracciones diferenciales para exudados vaginales se realizan por gradientes de temperatura y buffer de extracción. Primero se rompen las células vaginales a 56 °C por 10 minutos, se hace la lisis y se preparan frotis para observar si todavía hay células vaginales; después cuando ya estamos seguros de que solo hay espermatozoides se hace el proceso de extracción de DNA para éstos.

24. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR MEDIO DE KITS COMERCIALES^{8, 69}

Están basados en la afinidad eléctrica del DNA (cuya carga es negativa), mediante una resina magnética (cargada positivamente), para formar un complejo (resina-DNA) y con la ayuda de una barra imantada se hace posible la extracción del DNA.

Ejemplo DNA-IQ para muestras fijadas en telas.

- El kit contiene⁹⁵:
Buffer de lisis (100 µl de buffer + 1 µl de DTT), Buffer de lavado, buffer de elusión, Resina, Barra imantada en base para tubos.
- Se coloca la muestra en el tubo (tela 1 cm x 1 cm), se agrega 200 µl de buffer de lisis, agitar.
- Incubar 30 minutos a 56 °C. Retirar el soporte de la muestra (tela).
- Agregar 7 µl de resina. Incubar 1 hora a 56 °C.
- Se coloca en la barra imantada, se elimina el sobrenadante.
- Se retira de la barra, agregar 100 – 200 µl de buffer de lavado.
- Colocar en la barra imantada, eliminar sobrenadante.
- Se realizan 3 lavados, de igual forma.
- Retirar de la barra, eliminar el sobrenadante a sequedad.
- Agregar 50 µl de buffer de elusión.
- Calentar 2 minutos a 96 °C, para separar el DNA de la resina.
- Regresar a la barra magnética de inmediato para evitar que se unan otra vez.
- En la solución sobrenadante se encuentra suspendido en DNA. Debe pasarse a un tubo limpio 2–10 µl se llevan a PCR⁸¹.

25. RFLP'S. FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA⁴⁹

Generación de fragmentos de diferente longitud, a través de la digestión enzimática con enzimas de restricción, las cuales cortan al DNA en sitios específicos cada vez que encuentran una determinada secuencia de bases (aproximadamente 200–300 pares de bases).

Pasos de la técnica

- Extracción del DNA.
- Digestión y ruptura del DNA (por medio de las diferentes enzimas).
- Separación electroforética de los fragmentos (agarosa al 4%).
- Desnaturalización de la cadena (separar cadenas).
- Transferencia a una membrana.
- Hibridación de los fragmentos con sondas específicas (kits comerciales).
- Detección de los productos híbridos (quimioluminiscencia o autorradiografía).

Ventajas

1. Gran polimorfismo estadístico. La posibilidad de que dos personas tengan bandas iguales, es de 1 entre 250, así si se analizan un número mayor de loci, la probabilidad se eleva progresivamente hasta llegar a 1 entre 1 billón si se analizan 20 loci.
2. Requiere DNA integro. Es decir de alto peso molecular. En genética forense esto es un inconveniente por el tipo de muestra que se maneja: parcial o muy degradadas.

Desventajas

1. Requiere DNA integro. Es decir de alto peso molecular. En genética forense esto es un inconveniente por el tipo de muestra que se maneja: parcial o muy degradadas.
2. Cantidad de DNA requerido. En el ámbito forense, generalmente los indicios se presentan en cantidades muy pequeñas.

3. Complejidad de la técnica.

Los kits presentes en el mercado son:

| | | |
|---------------|-------------------|--|
| 1. HLA – DQA1 | 1 loci (marcador) | Salió del mercado en Dic. de 2002 |
| 2. POLIMARKER | 5 loci | Salió del mercado en Dic. de 2002 |
| 3. DS1S80 | 2 loci | PCR ⁸¹ y Separación electroforética |
| 4. D17S5 | 2 loci | PCR y Separación electroforética |

En las dos primeras técnicas se podían detectar polimorfismos específicos de alelos, utilizando sondas ASO (secuencias pequeñas conocidas), las cuales en condiciones adecuadas se unen a secuencias de DNA que contienen su secuencia complementaria.

En tiras de nylon se fijan sondas ASO. El DNA extraído se ponía en contacto con estas tiras (buffer y temperatura adecuadas) para que se hibridaran y donde esto ocurría se producía un color que permite ver el lugar de hibridación como un punto.

En la tercera y cuarta técnica después de la extracción, se utiliza la PCR⁸¹ para la replicación del material genético, seguido de los pasos antes mencionados para RFLP's es decir la utilización de enzimas restrictoras, electroforesis en gel, y los marcadores comerciales. Estas técnicas están actualmente en huso sobre todo en medicina e investigación: en genética forense ya no se usan, han sido remplazadas por los STRs.

26. PCR⁸¹

La Reacción en Cadena de Polimerasa⁶⁵, es un proceso In Vitro que permite incrementar la cantidad de un fragmento pequeño de DNA previamente seleccionado. Puede ser considerado como proceso de "fotocopiado molecular".

Los componentes básicos del proceso analítico son:

1. DNA problema.
2. Primers (oligonucleotidos, secuencias de DNA pequeñas y conocidas).
3. Buffer.
4. Enzima (más usada: Taq polimerasa).
5. dNTP's (deoxinucleotido trifosfatos).
6. Termociclador.

Etapas de la PCR⁸¹ por ciclo

1. Desnaturalización. La doble cadena se separa en dos cadenas simples (95 °C ó álcalis).
2. Emparejamiento o annealing. Las cadenas se vuelven a unir, de acuerdo al principio de complementariedad de bases (62 – 65 °C). El menor peso molecular de los primers, le da una ventaja de unión en comparación con toda la cadena complementaria que ya no se une a su pareja porque ya esta ocupada por los primers.
3. Extensión. Se incrementa la temperatura a 72 °C donde la Taq polimerasa tiene su mayor actividad. Su función es dar a la cadena complementariedad, es decir tomar los nucleótidos del medio y “llenar” los huecos que dejan los primers para obtener una doble cadena completa a partir de una cadena sencilla unida a primers.

En la práctica son 32 ciclos los que nos da 1.07 billones de copias de la región que se halla seleccionado con los primers.

Ventajas

1. Amplificación de indicios muy pequeños.
2. PCR⁸¹ múltiplex, permite trabajar con 16 loci tipo STR's⁷¹ en una sola secuencia de PCR⁶⁵ (al mismo tiempo).
3. Análisis de indicios degradados.
4. Tiempo.
5. Detección no radiactiva (actual fluorescencia).
6. Facilidad de interpretación (en forma de picos en la pantalla del aparato).
7. Disminución de probabilidad de error (menor manipulación).

Desventajas

1. Amplificación de contaminación biológica.
2. Inhibición de la PCR⁸¹.
 - iones metálicos (exhumación)
 - Tintes de cabello (varía)
 - Tratamiento de telas (mezclilla)

En la actualidad por medio de la técnica de Múltiple PCR⁸¹, se obtiene la amplificación de hasta 16 marcadores en una sola reacción, con una sensibilidad de menos 1 ng de DNA para iniciarla y pudiéndose tratar de muestras degradadas.

27. STRS SHORT TANDEM REPEATS

Son microsatélites⁶⁰ que están compuestos por secuencias repetidas en tandem cada una de las cuales tiene entre 2 y 7 pares de bases de longitud.

Son sumamente polimórficas si se utilizan 16 STRs se obtiene un 99.99% de posibilidades de identificar a un individuo, siempre teniendo con que compararlo: muestra de referencia.

La técnica se puede realizar de forma manual por electroforesis en gel⁸², o automatizada por electroforesis capilar.

Los kits en el mercado son:

| | MARCADORES | FABRICANTE |
|------------------|------------|---------------------|
| 1. COFILER PLUS | 6 loci | Applied Biosystem |
| 2. PROFILER PLUS | 9 loci | Applied Biosystem |
| 3. IDENTIFILER | 16 loci | Promega Corporation |
| 4. POWER PLEX 16 | 16 loci | Promega Corporation |

El uso de uno u otro depende del tipo de muestra y el poder de comparación que se necesite. Por ejemplo en una muestra de tejido óseo es más probable poder replicar 9 marcadores que 16 por el estado de degradación del material genético; mientras que en los casos de paternidad se utilizan siempre 16 marcadores, porque el estado y cantidad de la muestra son óptimos y el poder de discriminación requerido es muy alto.

Pasos de la técnica

- Extracción del DNA.
- Replicación por PCR⁸¹.
- Manual: electroforesis en gel.
Automatizado: electroforesis capilar.

- Contacto con marcadores comerciales.
- Manual: detección de bandas de fluorescencia.
Automatizado: obtención de electroferograma.

La determinación en todos los casos se hace con fluorescencia, cuando se hace de forma automatizada cada determinación requiere aprox. 32 minutos por muestra con 16 marcadores (loci), los resultados se emiten en forma de Electroferograma (detección de fluorescencia en forma de picos)¹⁵.

Mezclas

En la interpretación del número de bandas en la electroforesis o picos en el electroferograma, se observan 4 posibles bandas o señales para cada uno de los marcadores (loci). Pero como es sabido cada individuo posee solo dos alelos para una determinada característica, uno heredado del padre y uno de la madre, es decir, para un solo individuo se observaría una banda en el caso de los homocigotos (dos alelos del mismo tipo), y dos bandas para los heterocigotos.

Cuando en el resultado de alguno de los marcadores se observa más de dos señales (3 ó 4) estamos sin duda ante casos especiales, algunos de los cuales se mencionan brevemente a continuación:

Víctima y sospechoso

La interpretación de las muestras depende en mucho de las circunstancias que rodean el delito, como primer ejemplo están aquellas en donde se justifica que el DNA de la víctima este presente, como es el caso de las muestras obtenidas en una violación (ignorando la posibilidad de una extracción diferencial del DNA de esperma y células epiteliales), asumiendo que la víctima no tuvo contacto con DNA de otro individuo. Se plantean para cada uno de los casos dos hipótesis.

Mezcla de cuatro alelos

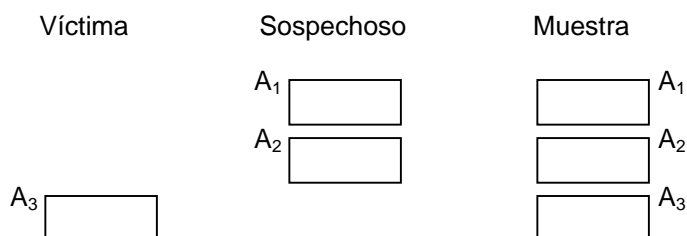
| Víctima | Sospechoso | Muestra |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | A ₁ <input type="text"/> | <input type="text"/> A ₁ |
| | A ₂ <input type="text"/> | <input type="text"/> A ₂ |
| A ₃ <input type="text"/> | | <input type="text"/> A ₃ |
| A ₄ <input type="text"/> | | <input type="text"/> A ₄ |

H_1 = La muestra del delito contiene DNA de la víctima y del sospechoso.

H_2 = La muestra del delito contiene DNA de la víctima y de otra persona.

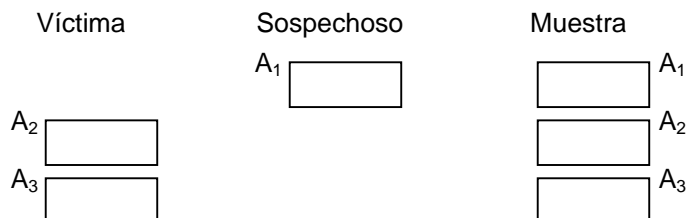
En este caso como en todos los demás donde hay una mezcla, el dictamen se basa en las probabilidades estadísticas de que los marcadores presentes que no pertenecen a la víctima, pertenezcan o no al sospechoso, con un determinado porcentaje de probabilidad, de acuerdo al número de marcadores coincidentes y la probabilidad de encontrar estos en el resto de la población. Pero si se encuentra un marcador que no pertenece a la víctima ni al sospechoso, esto excluye a éste.

Mezcla de tres alelos



Es el mismo caso que el anterior pero la víctima presenta alelos iguales, es homocigoto.

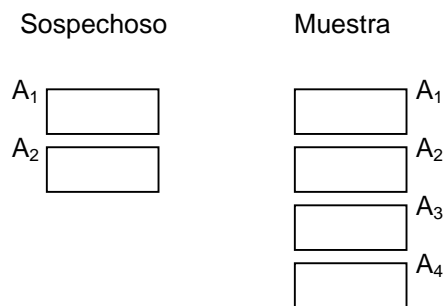
Mezcla de tres alelos



En este caso el homocigoto es el sospechoso.

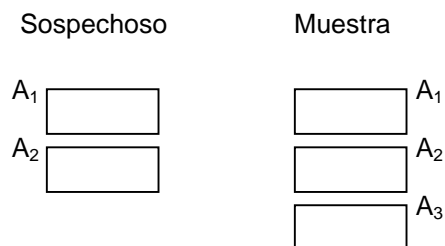
Sospechoso y alguna otra persona

Cuando se descarta la posibilidad de que la muestra contenga DNA de la víctima, pero los marcadores muestran 3 ó 4 alelos y se tenga solo un sospechoso, se analiza ésta en comparación con el DNA del sospechoso y se obtienen las hipótesis respectivas.

Mezcla de cuatro alelos

H_1 = La muestra del delito contiene DNA del sospechoso y de otra persona.

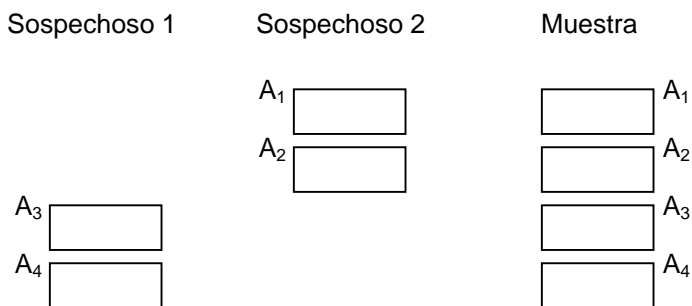
H_2 = La muestra del delito contiene DNA de otras dos personas.

Mezcla de tres alelos

Este resultado muestra un sospechoso heterocigoto y el material genético de otra persona homocigoto. En el caso contrario se mostraría solo una banda perteneciente al sospechoso y tres bandas en la muestra.

Dos sospechosos

Esta situación se presenta cuando una muestra es comparada con dos sospechosos de un delito como es el caso en donde las circunstancias del hecho hacen suponer la participación de dos personas, un ejemplo de estos delitos, es la violación tumultuaria, en donde el contenido vaginal de la víctima puede contener el DNA de ambos sospechosos, descartando por extracción diferencial el DNA propio de la víctima.

Mezcla de cuatro alelos

En donde se proponen tres hipótesis:

H₁ = La muestra del delito contiene DNA del sospechoso 1 y del sospechoso 2.

H₂ = La muestra del delito contiene DNA del sospechoso 2 (o del 1) y de otra persona.

H₃ = La muestra del delito contiene DNA de otras dos personas⁸.

En todos los casos (los aquí mostrados son solo algunos) se debe recordar que finalmente la prueba de DNA es siempre un proceso de comparación y su utilidad reside en esto y en tener una muestra de referencia para emitir un resultado; esto se complica grandemente cuando la muestra contiene material genético de más de una persona sea la víctima, otro sospechoso o cualquier otra persona que pudo haber estado en contacto con la misma antes o después de recogida la evidencia.

ETAPAS DE LA PRUEBA DEL DNA EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA FORENSE

La prueba del DNA aplicada a criminalística tiene cuatro etapas básicas:

1. Análisis laboratorial de la muestra, lo que incluye analizar el mayor número de polimorfismos DNA posible, obteniendo así un perfil genético de la muestra objeto de análisis (p., ej. Puede concluirse que la muestra posee los grupos HLA DQA1 3–4, TH01 8–10, FES 8–11 y VWA, 16–20).
2. Comparación de los resultados con los obtenidos en el inculpado o en la víctima. Ello implica que si aparece un vestigio biológico en la víctima se compara con el análisis genético del agresor, o si por ejemplo aparece una mancha de sangre en el agresor se compara con la sangre de la víctima.
3. Puede ocurrir que los patrones sean diferentes en uno o más grupos con lo que se concluirá que ese vestigio biológico no se corresponde con el individuo con el que se compara.

Pero puede suceder que los polimorfismos DNA analizados en el vestigio se correspondan con el individuo con el que se compararán. Entonces hay que valorar la probabilidad de que ese vestigio provenga de ese individuo, lo que depende de la frecuencia de esos grupos en la población. La tercera etapa del análisis es, pues, la valoración probabilística de la prueba en el caso de coincidencia de patrones.

4. Por último, la emisión del correspondiente informe medicolegal y, en su caso, la comunicación de los resultados en el juicio oral.

Estas etapas de análisis laboratorial que concluyen en el informe medicolegal tienen un precedente básico que es la correcta recogida y envío del vestigio al laboratorio. Estos aspectos han cobrado una importancia considerablemente mayor porque el valor de la prueba es, en ocasiones trascendente. Así, aspectos frecuentemente descuidados, como la denominada «cadena de custodia» del vestigio, han pasado a tener una enorme importancia⁶⁰.

En el informe o dictamen se debe entregar al ministerio público una descripción general de la muestra y los procedimientos a los que fue sometida así como los resultados que de ellas se derivan, la correspondencia entre dos muestras de DNA se evalúan matemáticamente por medio de modelos estadísticos que relacionan la concordancia entre ellas y las posibilidades de que ésta se dé entre dos individuos cualquiera de la población. El responsable del estudio debe explicar el significado de estos lo más claramente posible para lo cual se puede auxiliar de los predicados de Humeel una vez que el sistema a determinado la probabilidad.

PREDICADOS DE HUMEEL⁷⁷

| | |
|---------------|--|
| 99.73% | CORRESPONDENCIA "PRÁCTICAMENTE PROBADA" |
| 99 a 99.72% | CORRESPONDENCIA "EXTREMADAMENTE PROBADA" |
| 95 a 98.99% | CORRESPONDENCIA "MUY PROBABLE" |
| 90 a 94.99% | CORRESPONDENCIA "PROBABLE" |
| 50 a 89.99% | CORRESPONDENCIA "PROBABLE" |
| 10 a 49.99% | CORRESPONDENCIA "MÁS PROBABLE QUE NO" |
| 5 a 9.99% | CORRESPONDENCIA "MÁS PROBABLE QUE CORRESPONDENCIA" |
| 1 a 4.99% | CORRESPONDENCIA "IMPROBABLE" |
| MENOR A 0.99% | CORRESPONDENCIA "PRÁCTICAMENTE EXCLUIDA" |

Del mismo modo, dada la relevancia que la prueba posee en los delitos contra la libertad sexual, el hecho de que se analice el esperma en un porcentaje mínimo de los delitos denunciados y que no llegue muchas veces en buenas condiciones a los laboratorios forenses debería ser inmediatamente corregido¹⁵.

Hay discusión sobre la legislación referente al manejo y propiedad de la información genética⁶⁴, pues hasta el momento en nuestro país no existe esta regulación y es una deficiencia a nivel mundial.

El genoma humano caso reciente con problemas de ética por no saber ¿A quién pertenece esa información?. Se radicaliza la autonomización del genoma el poder que implica poseer tanta información científica se incrementará a niveles enormes, de modo que la libertad de quienes lo dominen derivará en la negación general de la libertad de los dominados. Los riesgos para la autonomía invocados por el sistema económico se multiplicaran, por que el poder genético parece ser incomparablemente más grande que el económico y además, este puede ser quien al fin controle el poder genético. Se reuniría un enorme poder para los actuales poderosos de la economía¹⁸.

RECOMENDACIONES BÁSICAS PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN⁴³

La CONTAMINACIÓN implica transferencia accidental de un DNA extraño a una muestra problema. Muestra problema es aquella que pretendemos analizar. Esta situación puede darse en dos momentos⁵².

- a) En el laboratorio donde veremos contaminación cruzada y,
- b) Contaminación asociada a la escena del crimen.

La primera ocurre como resultado de transferir un DNA externo a una reacción determinada, que resulta en una mezcla inexplicable o en un resultado confuso. La posibilidad de este tipo de contaminación se minimiza al tomar las siguientes medidas.

1. El laboratorio debe tener un diseño interior en el cual exista separación física de los procedimientos, con al menos 3 áreas separadas: una para la extracción de DNA, la segunda para amplificación (de preferencia un cuarto aislado) y una tercera, para el análisis de los productos de la PCR⁸¹. Mientras más aparataje mayores son las necesidades de espacio físico.

2. Todo el personal que trabaje en el laboratorio (técnico, administrativo y mantenimiento) debe estar genotipado, de tal manera que se pueda comprobar la existencia de contaminación por manipulación en cualquier momento.
3. El personal técnico debe utilizar siempre material de protección como guantes de látex, mascarilla, gafas de protección y mandil; tanto por evitar riesgo de infecciones como por proteger las muestras de nuestro propio material genético.
4. Tratar siempre de trabajar con la menor cantidad de instrumental posible, mientras menos instrumentos y material utilizado, esto incluye simplificar los procesos con menos pasos, menor es el riesgo de contaminación de las muestras.
5. Durante la extracción de DNA utilizar una cámara de filtración de gases, con el fin de evitar la contaminación aérea. Además, sirve para proteger al personal de posibles inhalaciones tóxicas.
6. En todos los procesos realizar TUBOS BLANCO que se corren paralelamente a la muestra problema, sin el DNA en estudio. Cuando se cuantifique por espectrofotometría no debe existir presencia de DNA, aunque algunos autores sugieren que se pueden aceptar cantidades aceptables mínimas de material genético en el blanco, siempre y cuando no supere el 10% de la cantidad medida. Luego, de amplificar, es deseable que tampoco exista material genético en los geles de agarosa. Se recomienda repetir todos los procedimientos cuando sea necesario.
7. Incluir CONTROLES POSITIVOS en los geles, la amplificación positiva debería dar una banda brillante en el gel de agarosa. La ausencia de esta banda invalida todas las muestras asociadas al set de amplificación. Repetir el procedimiento cuando sea posible.
8. Incluir también CONTROLES NEGATIVOS⁵⁹. Como en el numeral anterior pero no debe haber amplificación del control. Si se observa una banda no necesariamente se invalida el estudio. Se debe secuenciar la muestra para determinar el origen de la contaminación y evidenciar los posibles errores. Repetir la amplificación cuando sea necesario.
9. Cuando se amplifica no deben transcurrir más de 30 minutos desde que se prepara el master mix hasta llevar las muestras al termociclador. Al contrario, todos los procesos llevan un tiempo determinado, el hacer las cosas muy rápidamente puede desembocar en errores de contaminación.
10. No trabajar con grandes diluciones, mientras más pequeñas las cantidades con las que se trabaje menores riesgos de contaminación.

11. Tratar de evitar los errores de pipeteo, cuando los volúmenes son demasiado pequeños agrandar el número de muestras.
12. No utilizar toda la muestra original, guardar un poco si se necesita en lo posterior.

La contaminación asociada al crimen puede ocurrir por dos maneras:

Transferencia pasiva, condición producida por una transferencia accidental de DNA externo a la muestra problema, que podría estar restringida al período inmediato luego de suscitado el crimen; un ejemplo, durante la recolección de las muestras por el personal de investigadores. Este tipo de transferencia puede deberse a la presencia externa de saliva, estornudos, tos, sudoración, transpiración, manipulación durante su transporte, entre otros posibles eventos. Es una situación inusual pero que puede ocurrir; se conoce que la cantidad de DNA transferido es muy bajo.

Transferencia relevante al caso, ocurrida en ese sutil período de tiempo donde se perpetra un hecho criminal y cuando se está en contacto con el sospechoso, aunque no necesariamente se restringe tan sólo a esa etapa. En esta situación, durante la tipificación de perfiles genéticos, y en particular cuando se trata de manchas, podemos obtener un perfil diferente al sospechoso: Debido a esto necesitamos considerar las implicaciones de la presencia de una cantidad de DNA desconocido, el cual hace también sospechosa a la víctima. Tenemos dos posibilidades:

1. Que el DNA que fue transferido durante el curso del crimen sea de un perpetrador diferente al sospechoso, o
2. Que el DNA fue transferido antes o después del crimen y que por lo tanto, fuera de otro individuo.

Para resolver este problema inicial podemos tipificar el sustrato como un control negativo. El SUSTRATO es una zona adyacente al área del crimen, periférica, limitada por un fluido corporal dado. Al analizar esta zona, que podría ser de algún tipo de tejidos, podríamos encontrar:

1. Un perfil genético igual al del sospechoso con lo cual resolvemos el problema.
2. En su defecto no encontrar nada que también resuelve el asunto.
3. Por el contrario, encontrar nuevamente un perfil genético distinto al del sospechoso, con la práctica nos volvemos a encontrar ante dos condiciones, que el DNA encontrado sea de un perpetrador desconocido al crimen o, que el perfil resulte de la transferencia pasiva de cualquier otro individuo desconocido, que será inocente.

Ante este dilema podemos inferir dos conclusiones: primera, si los resultados han ocurrido como resultado de una transferencia pasiva entonces la evidencia todavía apoya la hipótesis que el DNA actualmente originado sea del sospechoso, aún bajo las circunstancias asociadas al hecho. Segunda, si la mancha de la muestra problema analizada ha sido de esperma, sangre o saliva, debemos realizar nuevas pruebas para reconfirmar cual es el tipo biológico de fluido que estudiamos. De esta manera, al no coincidir el tipo de fluido de la mancha con el de la muestra problema, descartaríamos al individuo inocente.

En conclusión se puede decir que generalizar es siempre difícil porque las circunstancias de cada caso son diferentes. La evidencia es solamente útil si es relevante al caso. No olvidar que en criminalística siempre existe la posibilidad de transferencia pasiva o de transferencia de un individuo ajeno al hecho, y que desde luego será inocente. Simplemente porque el perfil del DNA concuerda con un sospechoso, no significa que haya sido transferido durante el curso del crimen³⁸, en cualquier caso el trabajo del químico concluye aquí, brindando herramientas para que el juez determine la inocencia o culpabilidad del acusado y se llegue por medio de la ley a la justicia.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS



CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Achaval A. **Manual de Medicina Legal Practica Forense.** 3^o edición. Ed. Abeledo-Perrot: Argentina, 1988.
2. **Agenda Penal Federal y del D.F.** 2003. Ed. Raúl Juárez Carro SA.: México, 2003.
3. Allen M, Engstroöm A-S, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, Pañbo S, Gyllensten U. **Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities.** *J Forensic Sci* 1998;43(3):453-464.
4. Allery JP, Telmon, N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. **Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods.** *J Forensic Sci* 2001;46(2):349-351.
5. Ángel MG. **Interpretación Clínica del Laboratorio.** 5^o edición. Ed. Médica Panamericana: Colombia 1996.
6. Atekson BM, Calhoun KS, Morris KT. **Victim resistance to rape: the relationship of previous victimization, demographics, and situational factors.** *Arch Sex Behav*, 18: 497-507, 1989.
7. Azarcon DP. **Interrogatorio ofensivo.** *Philippine JOURNALISM Review*, enero-marzo 1999. *Las Filipinas*.
8. Balazs, I., Baird, M., McElfresh, K., y Shaler R. (1990). **Experimental techniques for the isolation and analysis of DNA from forensic materials.** *DNA in forensic science Ellis Horwood: Inglaterra.* 40-73.
9. Baldacini I, Drezett J, Miranda SD, Ribeiro RM, Pinotti JA. **Prevalência de doenças sexualmente transmissíveis em vítimas de violência sexual.** In: **Congreso Latinoamericano de Enfermedades de Transmisión Sexual, 11; Conferencia Panamericana de Sida, 5, Lima, 1997.** *Libro de Resúmenes. Lima, Union Latinoamericana contra las Enfermedades de Transmisión Sexual (ULACETS), 1997. p.181. (PCS392).*
10. Biggs M, Stermac LE, Divinsky M. **Genital injuries following sexual assault of women with and without prior sexual intercourse experience.** *CMAJ*, 159:33-7, 1998.
11. Bitangaro B. **La violación, el cáncer que no se habla entre las mujeres refugiadas.** "Women's vision" *The New Vision. Uganda*, 13 de julio 1999.

12. Bowyer L & Dalton ME. **Sexual assault in school, mental health and suicidal behaviors in adolescent women in Canada.** *Adolescente*, 32:361-6, 1997.
13. Burges, Holstrom. **Citado en Vargas AE. Medicina legal.** Ed. Trillas: México, 1998.
14. Castro–Dickerman. **Delitos Sexuales en Honduras. Recomendaciones al usar Lámpara de Wood. Trabajo de Exposición.** *Semana Científica de la UNAH. Facultad de Ciencias Médicas.* 1990.
15. Chávez Marín Gabriela. Jefe de Laboratorio de Genética PGR del Edo. de México.
16. Chen J, Kobilinsky L, Wolosin D, Shaler R, Baum H. **A physical method for separating spermatozoa from epithelial cells in sexual assault evidence.** *J Forensic Sci* 1998;43(1):114–118.
17. Ciencia y desarrollo. 108 (19). 50-60.
18. Ciuro CM. **Comprensión trialista del sentido comunitario del genoma humano. Bioética y Bioderecho. Fundación para las investigaciones jurídicas.** *Universidad Nacional de Rosario. Argentina, No. 6, 2001.*
19. **Código Penal Federal.** Ed. Raúl Juárez Carro SA.: México, 2003.
20. Cohen C & Matsuda NE. **Crimes sexuais e sexología forense: estudio analítico.** *Rev Paulista Med*, 109:157-64, 1991.
21. Curtis, H y Barrios S. (1993) **Biología.** 5' ed. *Medica panamericana: Buenos Aires. Pag. 413-414.*
22. Deming JE, Mittleman RE, Wetli CV. **Forensic science aspects of fatal sexual assaults on women.** *J Forensic Sci*, 28:572-6, 1983.
23. Deyoung M. **Disclosing Sexual Abuse.** *Child Welfare.* 1987; 217–223.
24. Diario del SCSJ 1996, Marzo de 1996, Volumen 29 Número 1.
25. Dupre AR, Hampton HL, Morrison H, Meeks GR. **Sexual assault. Obstet Gynecol Surv**, 48:640-8, 1993.
26. Elu MC, Pruneda ES, Santiago RV, Monreal LMA, Pérez RC, Rivera M, Acha M. **Atención en los servicios de salud de mujeres embarazadas víctimas de violencia.** *Mexico. Comité Promotor por una maternidad sin riesgos en México.* 2000. 34p.

-
27. Evett WI, Weir SB. **Interpreting ADN Evidence Statistical Genetics for Forensic Scientists.** Ed. *Sinaver Associates Inc.: USA, 1998.*
 28. Franco de AM. **Hematología Forense y otras Técnicas Serológicas.** 4^o edición. Ed. *Porrúa. México, 2002.*
 29. García AJ. **Lo que me contaron los muertos, recuerdos y experiencias de un médico forense.** Ed. *Ediciones Temas de Hoy: España, 1994.*
 30. Garvin A. M, **Filtration Based DNA Preparation for Sexual Assault Cases.** *J Forensic Sci, September 2003, Vol. 48, No. 5 Paper ID JFS2002413_485.*
 31. Garza-Aguilar J & Diaz-Michel E. **Elementos para el estudio de la violación sexual.** *Salud Publica Mex, 36:36-45, 1994.*
 32. Gill P., Jefreys, A. J., y Worrel, D. J. (1985). **Forensic application of DNA fingerprints.** *Nature 318 577-579.*
 33. Gisbert Calabuig Juan A. **Medicina Legal y Toxicología.** 5^a edición. Editorial *Masson S.A. España 1998.*
 34. Gisbert CJ. **Medicina Legal y Toxicología.** 4^a edición. Ed. *Salvat Editores: España, 1991.*
 35. Giusti, A., Baird, M., Pasquale. S., Balazs, L, y Glassberg, J. (1986). **Application of deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphisms to the análisis of DNA recovered from sperm,** *J. Forens. Sci. 31 409-417.*
 36. Gladis Ferrer. Artículo del periódico *Reforma* 11/07/2003 pág. 7
 37. Glaser JB, Hammerschlag MR, McCormack WM. **Epidemiology of sexually transmitted diseases in rape victims.** *J Infect Dis, 11:246-54, 1989.*
 38. González AF, Martínez JM. **Técnicas Instrumentales en Genética Forense.** Ed. *Institución Fernando el Católico: España, 2001.*
 39. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA. **QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework.** *J Forensic Sci 1998;43(5):1024-1030.*
 40. Groleau GA, Jackson MC. **Forensi Examination of victim and perpetrator of sexual assault** En: *Olshasker SJ, Jackson MC; Smock WS, Editores. Forensic Emergency Medicine. EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:85-103.*
-

41. Gross AM, Harris KA, Kaldun GL. **The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction.** *J Forensic Sci* 1999;44(4):837–840.
42. Heise L, Pitanguy J, Germain A. **Violence against women: the hidden health burden.** Washington, *The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank*, 1994. 255p.
43. Henry RJ. **Química Clínica, Principios y Técnicas.** 2º edición. Ed. JIMS: España, 1980.
44. Hicks DJ. **Rape: sexual assault.** *Am J Obstet Gynecol*, 137:931-5, 1980.
45. Hillmann, GZ *Clin. Chem, Biochem* 9,273 (1971)
46. Honda K, Roewer L, de Knijff P. **Male DNA typing from 25-year-old vaginal swabs using Y chromosomal STR polymorphisms in a retrieval request case.** *J Forensic Sci* 1999;44(4):868–872.
47. Instituto Nacional de Toxicología. **Normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis.** No. 108, de 23 de diciembre de 1996.
48. Johnson Elizabeth et al: **Detection of Prostate Specific Antigen by ELISA.** *J. Forensic Sci* 1993;38 (2):250–258.
49. Kanter, E., Baird, M., Shaler, R., y Balazs, I., (1986) **Analysis of restriction fragment length polymorphisms in deoxyribonucleic acid (DNA) recovered from dried bloodstains.** *J., Forens. Sci.* 31 403-408.
50. King Strasinger Susan. **Líquidos Corporales y Análisis de Orina.** Edit. *El Manual Moderno. México D. F.* 1991.
51. Knight B. **Medicina Forense de Simpson.** 2º edición. Ed. *El Manual Moderno: México*, 1999.
52. Lee HC Ladd, C, Scherczinger CA, Bourke MT. (1998) **forensic applications of ADN tipyng: collection and proservation of ADN evidence.** *Am J Forensic Med Pathol.* 19: 10-18.
53. Lee HC, Gaensslen RE, Bigbee MS, Kearney JJ. (1991). **Guidelines for the collection and preservation of ADN evidence.** *Journal of Forensic Identification.* 41:344-356.
54. Lee, C.H., Ladd, C. (2001) **Preservation and collection of biological evidence"**, *Croahan Medical Journal*, 43(3):225-228.
55. Legorreta H y Soto 1. (1998). **Curso teórico-practico "Determinación de citocinas.** *Por RT-PCR. FES Zaragoza.*

-
56. Linch CA, Smith SL, Prahlow JA. **Evaluation of human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison.** *J Forensic Sci* 1998;43(2):305–314.
 57. Linch CA, Whiting DA, Holland MM. **Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist.** *J Forensic Sci* 2001;46(4):844–853.
 58. Lorente Acosta J. A. & Lorente Acosta M. **El ADN en la Identificación Criminal y en la Paternidad biológica.** Editorial Comares. España 1995.
 59. Lorente M y Lorente JA (1994). **La Medicina Clínica ante los indicios biológicos criminales y la identificación genética clínica: 113-115.**
 60. Martínez JM. **La prueba del ADN en Medicina Forense, la genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad.** Ed. Masson: España, 1999.
 61. Martínez MS. **Medicina Legal.** 16° edición. Ed. Méndez Editores: México, 1991.
 62. McCabe E.R.B., Huang, Shu-Zhen, Seltzer, W. K y Law, M. L. (1987) **DNA microextraction from dried blood, spots on filter paper blotters: potencial applications to newborn screening.** *Hum. Genet.* 75 213- 16.
 63. Moreno G.R., (2000) **"Los indicios biológicos del delito"**. Instituto Nacional de Ciencias Penales, México. Pág. 89.
 64. Moreno, Miguel **"Implicaciones éticas, sociales y legales del Proyecto Genoma Humano"**. *Rev. Proyección (edita la Facultad de Teología de Granada)*, nº 178, julio-septiembre de 1995, pp. 179-200.
 65. Mullis, K. (1990). **"Reacción en cadena de la polimerasa"**. *Investigación y ciencia.* No. 165, 30-37.
 66. National Victim Center, Crime Victims Research and Treatment Center. **Rape in America: A Report to the Nation.** South Carolina, Dept of Psychiatry and Behavioral Sciences, 1992. 287p.
 67. OMS **Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical.** Ed. Panamericana: Argentina 1987.
 68. Penacino Gustavo Adolfo. **Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular, con especial referencia a los estudios post-mortem.** Tesis que para obtener el título de Químico Forense. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
-

69. Perkin-Elmer (1997). **User's manual "AmpFester Profiler. PCR amplification kit"**. *The Perkin-Elmer Corporation. USA.*
70. Poder Judicial, Médico Forense.
71. Puello, M y Balazs, I. (1983). **Direct hibridizatio of single -copy DNA sequences to DNA in agarose gels.** *Anal.Biochem.* 128 393-397.
72. Raffo OH. **La Muerte Violenta.** *Ed. Universidad: Argentina, 1997.*
73. Richard C. Li, Howard A. Harris, **Using Hydrophilic Adhesive Tape for Collection of Evidence for Forensic DNA Analysis***. *J Forensic Sci, November 2003, Vol. 48, No. 6 Paper ID JFS2003121_486.*
74. Rickert VI, & Wiemann CM. **Date rape among adolescents and young adults.** *J Pediatr Adolesc Gynecol, 11:167-75, 1998.*
75. Roitt Ivan M. **Inmunología.** 7ª edición. *Editorial Panamericana. Argentina 1994.*
76. Rojas Neiro. **Medicina Legal.** 12ª edición. *Editorial El Ateneo. Argentina 1982.*
77. Romero Rentería Blanca Edith. **Estudio de manchas de semen en la investigación de delitos sexuales.** *Tesis que para obtener el título de Química Farmacéutico Biológica. UNAM, México, 2004.*
78. Ruíz García Diana Minerva. **STR's Como marcadores genéticos de identificación forense.** *Tesis que para obtener el título de Química Farmacéutico Biológica. UNAM, México, 2004.*
79. Russel D. **The secret trauma: incest in the lives of girls and women.** *New York, Basic Books, 1986. 464p.*
80. Saffioti HIB & Almeida SS. **Violência de gênero: poder e impotência.** *Rio de Janeiro, Revinter, 1995. 218p.*
81. Saldaña H., López. R., Martínez, A. Y Pérez, D. (1993). **"Reacción en cadena de la polimerasa,".**
82. Schwartz, D. y Cantor, C. (1984). **Separation of yeast chromosomes-sized DNAs by pulse field gradient agarose gel electrophoresis.** *Cell* 37 67-75.
83. Seo Y, Uchiyama T, Matsuda H, Shimizu K, Takami Y, Nakayama T, Takahama K. **Mitochondrial DNA and STR Typing of Matter Adhering to an Earphone.** *J Forensic Sci* 2002;47(3):605–608.

-
84. Solís CB. **Técnicas de Tinción para Espermatozoides. Reporte de Servicio Social.** *Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza. 1998.*
 85. Stoilovic M. **Detection of semen and bloodstains using the Polilight as a light source.** *Forensic Sci Int 1991;51:289–96.*
 86. Stone AC, Starrs JE, Stoneking, M. **Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James.** *J of Forensic Sci 2001;46(1):173–176.*
 87. Trujillo NG, **Medicina Forense.** Ed. *Ciencia y Cultura Latino Americana S. A. de C. V.: México, 1999.*
 88. Vargas AE. **Medicina legal.** Ed. *Trillas: México, 1998.*
 89. Vargas Alvarado Eduardo. **Medicina Legal.** Editorial *Trillas, México 1999.*
 90. Vollenhoven. S. **Tarea especial: tema, La violación.** *South African Broadcasting Corporation–TV. Sudáfrica, 8 Junio 1999.*
 91. Webb LG, Egan SE, Turbett GR. **Recovery of DNA for forensic analysis from lip cosmetics.** *J Forensic Sci 2001; 46(6):1474–1479.*
 92. Westcott DL. **Sexual abuse of children: a hospital-based study.** *S Afr Med, 65:895-7, 1984.*
 93. Williams, G. T. (1987). **Higli-efficiency preparation of DNA from limiting quantities of eukaryotic cell for hybridization analysis.** *Gene 53 121-126.*
 94. Yasuda T, Lida R, Takeshita H, Ueki M, Nakajima T, Kaneko Y, et. al. **A Simple Method of DNA Extraction and STR Typing from Urine Samples Using a Commercially Available DNA/RNA Extraction Kit*.** *J Forensic Sci, Jan. 2003, Vol. 48, No. 1 Paper ID JFS2002184_481.*
 95. Zamenhof, S. (1957). **Preparation and assay of deoxiribonucleic and from animal tissue.** In *Colowick, S.P. y Kaplan, O.)eds), Methods in enzymology 3, Academic Press, New York, 696-704.*