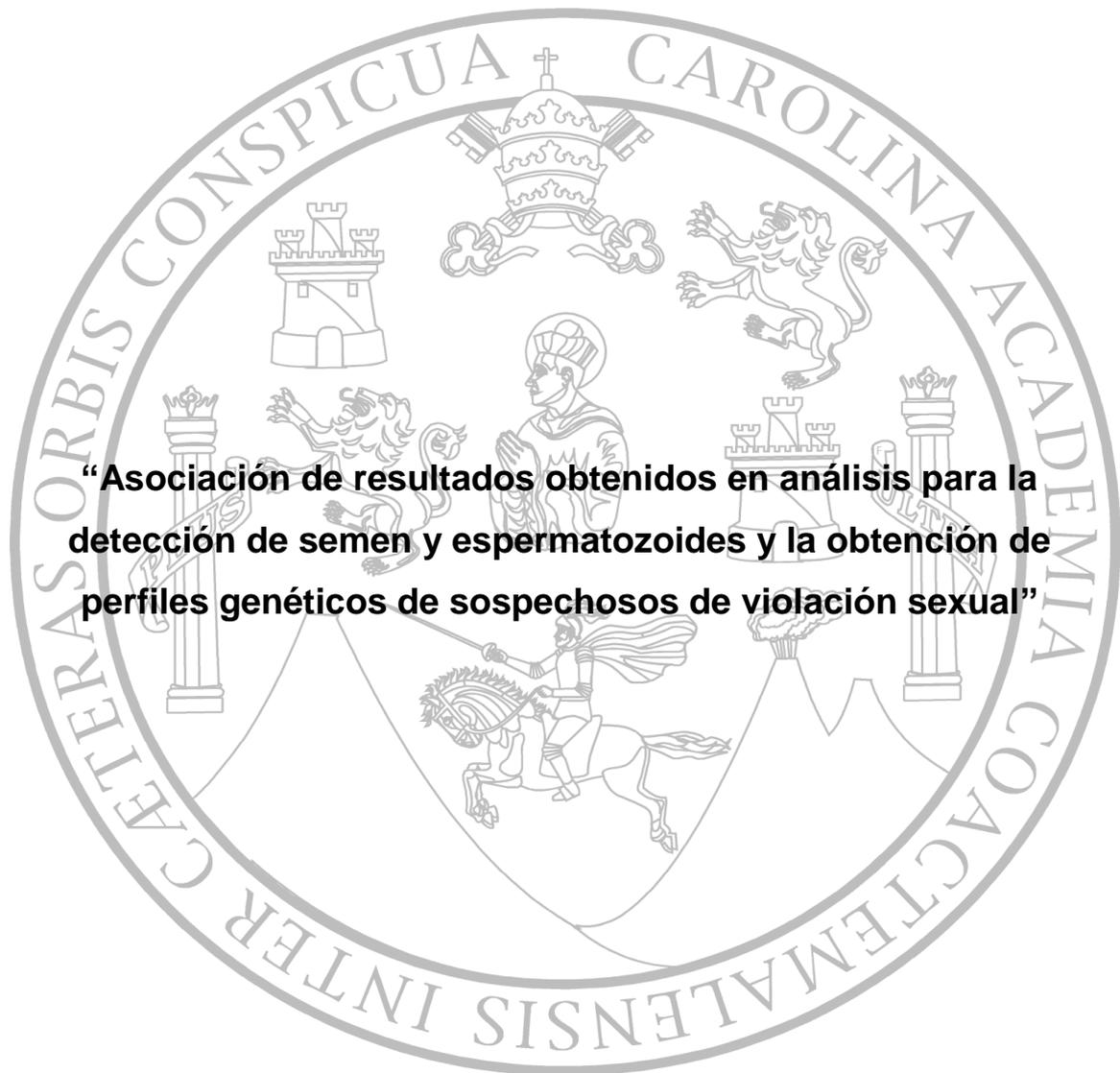


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



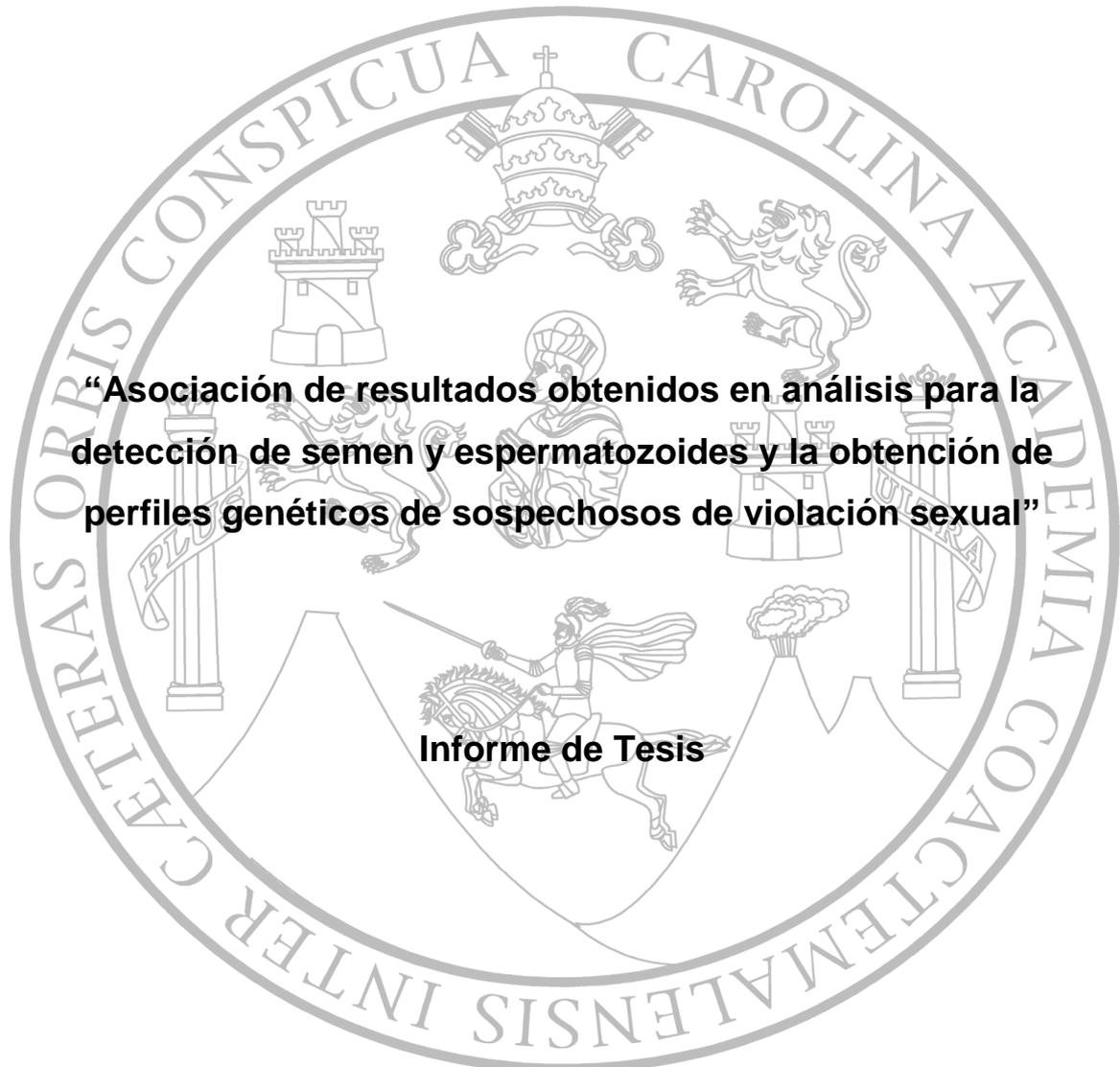
**“Asociación de resultados obtenidos en análisis para la  
detección de semen y espermatozoides y la obtención de  
perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual”**

**Marco Antonio García Jiménez**

**QUIMICO BOIOLOGO**

**Guatemala, Junio 2012**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**“Asociación de resultados obtenidos en análisis para la  
detección de semen y espermatozoides y la obtención de  
perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual”**

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**Marco Antonio García Jiménez**

**Para optar al título de**

**QUIMICO BILOGO**

**Guatemala, Junio 2012**

## JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

## DEDICATORIA:

A mis padres, quienes son un ejemplo de amor y perseverancia, que con esfuerzo y sacrificios me brindaron la oportunidad de conseguir este logro y con sus consejos y apoyo incondicional han hecho de mí una persona bien, con metas y ambiciones, pero por sobre todas las cosas me han enseñado a ser feliz.

A mis hermanos, por compartir tantos momentos conmigo, por todo su apoyo durante toda mi vida y porque a cada uno le debo parte de lo que soy.

A Juan Carlos Mérida, que en paz descanse, amigo del alma a quien todos sus amigos lo quieren, lo recuerdan y lo extrañan.

## AGRADECIMIENTO:

A mis asesoras, por todo el conocimiento, empeño, esfuerzo y dedicación brindados, sin su colaboración este trabajo no hubiese sido posible.

A mis amigos y mi novia, por enriquecer mi vida con su compañía y por apoyarme fielmente durante tanto tiempo.

A mis amigos universitarios, por haber compartido todos los desvelos y sacrificios, pero especialmente por compartir las alegrías y aventuras de la carrera.

A mis amigos y compañeros del Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, por todo su apoyo y conocimientos compartidos.

A la Dra. Myriam Ovalle de Monroy y la Licda. Myra Elizabeth Custodio Cruz, por brindarme su confianza y apoyo para realizar el presente trabajo en INACIF.

A mis revisores, catedráticos y todas las personas que contribuyeron con mi formación profesional y al alcance de esta meta.

## INDICE

TEMA	PÁGINA
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	
A. El Delito de violación sexual	4
B. Investigación del delito, manejo y recolección de Indicios	5
C. Características del semen	8
D. Detección de semen y espermatozoides	9
1. Fosfatasa Ácida	11
2. Proteína Seminal P-30	13
3. Tinción de Árbol de Navidad	14
E. El ADN y los análisis genéticos	16
F. Extracción de ADN	18
1. Extracción de ADN a partir indicios de referencia	19
2. Extracción diferencial de ADN	20
G. Cuantificación de ADN	21
H. Amplificación de ADN por PCR	23
I. PCR en tiempo real	24
J. Ensayos para identificación humana	27
K. Obtención y comparación de perfiles genéticos por electroforesis capilar	29
J. Análisis Estadístico	31
K. Interpretación de resultados genéticos	34
L. Datos obtenidos por estudios previos	34
IV. Justificación	36
V. Objetivos	37
VI. Hipótesis	38
VII. Materiales y Métodos	39
VIII. Resultados	51
IX. Discusión de resultados	55
X. Conclusiones	59
XI. Recomendaciones	60
XII. Referencias	61

## I. Resumen

Los casos de violaciones sexuales generalmente son crímenes sin testigos, por lo que la evidencia científica forense, se convierte en una herramienta decisiva para esclarecer estos hechos delictivos. En el sistema de justicia guatemalteco, el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala –INACIF-, recibe las solicitudes de análisis genético comparativo para asociar a un sospechoso de violación sexual, víctima y/o escena del crimen. Para este fin, INACIF utiliza una combinación de métodos bioquímicos e inmunológicos para determinar la presencia de semen y espermatozoides. En primer lugar se determina la presencia de la enzima fosfatasa ácida (FA), como indicador de la presencia de semen junto con la determinación de proteína seminal humana P-30, utilizando la prueba One Step ABACard PSA®, que determina la presencia de fluido seminal por inmunocromatografía. Para observar la presencia de espermatozoides al microscopio se utiliza la tinción de árbol de navidad (AN). Los análisis genético forenses son eminentemente comparativos, por lo que al momento de contar con muestras provenientes de sospechosos, indicios de la escena y muestras de la víctima, estos son sometidos a un proceso analítico que incluye: extracción de ADN, cuantificación, amplificación y tipificación (electroforesis capilar). El objetivo de dichos análisis, es determinar si el perfil genético que se obtenga de los indicios recuperados de la escena, coincide con el perfil genético del sospechoso (Benton, Donahu y Valdez, 1998; Li, 2008).

Los indicios biológicos relacionados con delitos sexuales generalmente involucran una mezcla de fluidos de la víctima y el sospechoso, por ejemplo, en un hisopado vaginal se recuperan células epiteliales de la víctima y semen del sospechoso. Para separar el ADN proveniente de los mismos, se utiliza un procedimiento denominado extracción diferencial, en la cual, el ADN de las células epiteliales (presumiblemente de la víctima), es extraído con dodecilsulfato sódico (SDS), y proteinasa K. Luego de separa por centrifugación, el sobrenadante que contiene el ADN de las células epiteliales -fracción femenina-, se extrae a partir del sedimento, el ADN de las células espermáticas con una mezcla de SDS, proteinasa K y ditioneitol (DTT), -fracción masculina-. También se extrae el ADN proveniente de las muestras de la víctima y el sospechoso utilizando el método Chelex. El ADN obtenido, es cuantificado utilizando el kit Quantifiler Human®, a través de PCR en tiempo real. Conociendo la cantidad y calidad de ADN presente en las muestras analizadas, el mismo es amplificado,

utilizando los kits Identifiler Plus® y/o Y-filer® en una reacción por PCR. Finalmente, se obtiene el perfil genético de las muestras analizadas, realizando una electroforesis capilar (Butler, 2005; Marrakchi y Maibach, 2006).

Los perfiles genéticos obtenidos se cotejan realizando un estudio comparativo, si se presenta una inclusión (coincidencia entre el perfil genético del sospechoso y el perfil genético de los indicios), los datos son analizados estadísticamente para establecer la razón de verosimilitud o tasa de probabilidad comúnmente conocido como Likelihood Ratio (LR), para reportar la tasa de probabilidad de coincidencia entre dos perfiles genéticos (Ayyub, y McCuen, 2003).

El presente estudio determinó la asociación existente entre los resultados obtenidos de los análisis de FA, P-30 y la tinción de AN y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual en 137 casos analizados por INACIF de enero de 2010 hasta septiembre del 2011. Para establecer dicha asociación, se elaboraron tablas de 2x2, determinando los valores de OR, Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y “p”, con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Los resultados mostraron que el análisis que presenta mayor asociación con la obtención de perfil genético, es la detección de proteína seminal humana P-30 con un OR de 6.79 (IC 95% = 1.17-38.58),  $\chi^2$  5.89 y “p” de 0.018. En adición, se estableció que tanto la detección de la enzima FA ( $p = 0.037$ ), proteína seminal P-30 ( $p = 0.018$ ), y la observación de espermatozoides a través de la tinción de AN ( $p = 0.027$ ), muestran asociación estadísticamente significativa con la obtención de perfiles genéticos de sospechosos. Así mismo, se estableció una frecuencia de obtención de perfiles genéticos de 75.2%, siendo las prendas de vestir íntimas femeninas, los indicios que presentaron mayor coincidencia entre la detección de fluidos masculinos y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos, con una frecuencia de 88.37% (Vicéns y Medina, 2005).

## II. Introducción

En Guatemala, existe un alto índice de casos de violación sexual. En el año 2009 el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala –INACIF- recibió más de 10,000 indicios para ser analizados, asociados a este tipo de delito. Dichos indicios van desde hisopados vaginales, orales, anales y otros provenientes de regiones anatómicas donde se sospeche la presencia de fluidos biológicos, hasta prendas de vestir y otras superficies que puedan contener material biológico útil para ser analizado (Guatemala, INACIF 2009).

El semen y los espermatozoides son encontrados con mayor frecuencia en indicios provenientes de agresiones sexuales, por lo que actualmente existen procedimientos universales para su detección e identificación. Entre estos procedimientos se incluye la detección de la enzima fosfatasa ácida (FA) que indica presencia presuntiva de semen, utilizando el reactivo Brentamina para su identificación. La detección de Proteína Seminal P-30 o Antígeno Prostático Específico (PSA), a diferencia del carácter presuntivo de la FA, confirma la presencia de fluido seminal humano, ya que es una glicoproteína secretada por la próstata y presente en dicho fluido. Finalmente, se investiga la presencia de espermatozoides a través de la tinción de los mismos por el método de Árbol de Navidad. Una vez realizados dichos análisis y determinada la presencia de semen y/o espermatozoides, se busca establecer si existe en ellos Ácido Desoxirribonucleico (ADN) útil para poder obtener un perfil que pudiera ser comparado con el perfil genético de el(los) sospechoso(s) (Benton, Donahu y Valdez, 1998; Hochmeister, Rudin, Borer, Kratzer, Gehrig y Dirnhofer, 1999).

Actualmente no existen estudios que establezcan la asociación existente entre la obtención de perfiles genéticos, y los resultados obtenidos en la detección de semen y espermatozoides, a partir de indicios provenientes de casos de violación sexual. Por lo que el presente estudio busca establecer dicha asociación, determinando estadísticamente, la relación que existe entre dichos resultados y la posterior obtención de un perfil genético. Además busca determinar cómo influye el tipo de indicio analizado y su procedencia en los resultados obtenidos por la Sección de Genética de INACIF, brindando así, herramientas útiles para poder presentar con un mayor soporte científico, los resultados genéticos obtenidos. La determinación de dicha asociación se realizará estableciendo la razón de posibilidades (odds ratio –OR-), existente entre la obtención de un perfil genético y cada una de las tres pruebas utilizadas para la determinación de semen y espermatozoides.

### III. Antecedentes

#### A. El delito de violación sexual

El 15 de septiembre de 1973 el Organismo Legislativo a través del Decreto 17-73 promulgó el Código Penal que se encuentra actualmente en vigencia, en dicho código se encontraba tipificado el Delito de Violación en el artículo 173, y en los artículos 174 al 178 se añaden agravaciones de la pena y otros delitos sexuales como el estupro y los abusos deshonestos. Sin embargo, estos artículos no abarcaban la diversidad y complejidad que caracterizan este tipo de delitos, por tal razón, en el año 2009 fue publicada por el congreso de la República la “Ley contra la violencia sexual, explotación y trata de personas”, que modifica los artículos 173 y 174 ampliándolos en aspectos muy importantes, por ejemplo cambiar la palabra “mujer” por la de “persona” en la definición de violación, lo que permite a la ley abarcar los delitos cometidos contra personas de sexo masculino. Además elimina la palabra “yacer” que según el diccionario de la Real Academia Española en alusión a una persona significa “estar echada o tendida” o también puede interpretarse como “tener trato carnal con alguien”, ambas definiciones son escuetas y dejan lugar a diferentes interpretaciones, por lo que la nueva ley especifica: *“Quien con violencia física o psicológica, tenga acceso carnal, vía vaginal, anal o bucal con otra persona, o le introduzca cualquier parte del cuerpo u objetos por cualquiera de las vías señaladas, u obligue a otra persona a introducirselos así misma”* (Guatemala, 1973; Guatemala, 2009).

Esta nueva definición de violación cubre varios aspectos no tomados en cuenta por el artículo 173 original. En cuanto a los agravantes mencionados en el artículo 174 original, se agregan como situaciones que merecen el aumento de la pena, circunstancias como la utilización de armas, sustancias alcohólicas, narcóticas y/o estupefacientes; cuando se cometa contra una mujer en estado de embarazo o que se provoque como consecuencia del acto; el contagiar de enfermedades de transmisión sexual; y finalmente es un agravante que el autor del hecho sea un funcionario público en ejercicio de sus funciones (Guatemala, 2009).

Los artículos 175 al 178 que incluyen los delitos de estupro y abusos deshonestos quedan derogados en la nueva publicación. En adición esta ley crea la Secretaría contra la violencia sexual, explotación y trata de personas y

define sus funciones, tipificando además los delitos de explotación y trata de personas, dejando así de ser Guatemala uno de los pocos países que no tenía tipificados dichos delitos, que según Adriano González Regara representante de UNICEF, se calcula que existen 15 mil víctimas de este flagelo a nivel nacional (Diario de Centro América, 2009; Guatemala, 2009).

La violación sexual es uno de los delitos más comunes en la sociedad guatemalteca, en el año 2009 se presentaron 4,618 denuncias de violación, que representó el 1.81% del total de denuncias recibidas por el Ministerio Público (MP) en el año 2009. Sin embargo, para poner en contexto la importancia de dicho dato cabe destacar que delitos comunes y de menor gravedad como el robo, amenazas y hurto representan el 52.37% de las denuncias y otros delitos de mayor impacto como homicidio y extorsión combinados figuran como el 5.36% de los casos registrados. En adición debe tomarse en cuenta que por la naturaleza de dichos delitos, el impacto que tienen sobre las víctimas y los estigmas de las sociedades actuales muchos de ellos no son denunciados (Guatemala, MP 2009).

## **B. Investigación del delito, manejo y recolección de indicios**

Durante la investigación de los delitos de índole sexual debe asegurarse que cualquier indicio que pueda ser útil para la investigación debe ser recolectado de forma adecuada y cumpliendo con los procedimientos legales. El término indicio proviene de latín *indictum*, que significa signo aparente y probable de que existe alguna cosa, y a su vez es sinónimo de señal, muestra o indicación. Por lo tanto, es todo material sensible significativo que se percibe con los sentidos y que tiene relación con un hecho delictivo. Los indicios son cualquier elemento biológico o no biológico presente sobre el cadáver o en el lugar del crimen, cuyo estudio permite determinar, en los casos más favorables, la identidad del autor y las circunstancias de los hechos. En los delitos de violación sexual los indicios más comunes son los hisopados vaginales, anales y orales, además de ropa interior y otras prendas de vestir (Fuertes, 2007; Jiménez, 2004).

Cuando se trata de prendas de vestir es necesario embalar por separado cada prenda de la víctima o el agresor que interese en la investigación. Un indicio prácticamente obligatorio de recuperar es la ropa interior que la víctima vestía durante los hechos, también puede ser útil la ropa interior del agresor si

ha sido detenido el día de los hechos y esta presenta manchas de sangre. Lo cual ha sido particularmente útil en los casos de violaciones a menores, donde se ha podido demostrar que el ADN recuperado de estas manchas de sangre, corresponden al menor agredido y que los espermatozoides encontrados en el menor coinciden con el sindicado. Además de la ropa interior se recolectan las prendas y otros objetos que de acuerdo a la historia relatada por la víctima o por información recabada por los investigadores pudiera contener fluidos biológicos del agresor, por lo que al INACIF ingresan diferentes tipos indicios como cortes típicos, güipiles, pantalones, sábanas, toallas, cubrecamas entre otros (Paredes, 1988).

Los hisopados son tomados de las regiones anatómicas de donde se sospeche que existe material biológico del agresor, y así poder utilizarlo para vincularlo con la víctima. Generalmente, se recolectan tres hisopos por región anatómica evaluada, estos son embalados en sobre de papel luego de haberlos dejado secar al aire por un breve tiempo para evitar que la humedad favorezca el crecimiento de microorganismos que pudieran degradar el material biológico presente (California Commission on Peace Officer Standards and Training, 1999).

Otros indicios menos comunes como vellos púbicos o cabellos encontrados en la escena, raspado de uñas de la víctima según el relato de los hechos y preservativos también son recolectados de la escena. La cultura guatemalteca hace que en muy pocas ocasiones sea utilizado preservativo durante la violación, sin embargo, de estar presente constituye un medio altamente informativo. Si el agresor usa condón, es muy probable que lo abandone cerca de la escena y sea fácil recuperarlo. Deberá manipularse lo menos posible, utilizando un hilo resistente o una banda de caucho, debe anudarse cuidadosamente en la base para cerrarlo y evitar que se pierda su contenido; luego se embala en una bolsa debidamente rotulada. Esta muestra permite relacionar a dos personas con una escena, ya que en la superficie externa del preservativo es factible encontrar una cantidad considerable de células epiteliales de la víctima, y así mismo espermatozoides del violador en la superficie interna, Si se recupera varios condones, cada uno debe embalsarse adecuadamente en bolsas independientes (Paredes, 1988).

Debido a que los análisis forenses de ADN se refieren al estudio comparativo de perfiles genéticos, es necesario obtener las muestras de ADN de la víctima y el (los) agresor (es) involucrado (s) en el hecho que servirán como referencia (Mbogori, Kimani, Kuria, Lagat y Danson, 2006).

En Guatemala por razones culturales, la muestra más utilizada es la sangre fijada en papel FTA (Flinders Technology Associates) o papel filtro, que es recolectada por punción capilar en dedo anular, colocando una gota por círculo en dos tarjetas de papel FTA. Si se trata de papel filtro se colectan también cuatro gotas en dos piezas del papel. El papel FTA es ideal para la recolección de la muestra ya que está diseñado específicamente para proteger ADN de la degradación por nucleasas, contaminación con microorganismos y otros agentes. Son recolectadas en menor medida muestras de células epiteliales de la cavidad bucal, tomadas frotando un hisopo en la cavidad oral de la persona a la que se le toma la muestra. El material obtenido es luego transferido a la tarjeta de papel FTA rotando suavemente el hisopo sobre la misma. Luego de haberse recolectado las muestras de referencia se convierten en indicios indubitados (ya que se conoce su procedencia). Es importante señalar que los términos muestra e indicio son comúnmente utilizado indistintamente en ciencias forenses y en el sistema de justicia Guatemalteco (Mbogori, Kimani, Kuria, Lagat y Danson, 2006).

Para cumplir con los procedimientos legales necesarios y darle valor probatorio frente a un juez a los indicios trabajados –incluidas las muestras de referencia-, son manejados bajo los principios de la cadena de custodia, que no es más que un sistema de estricta y cuidadosa ejecución que se aplica sobre las evidencias, para garantizar la seguridad, preservación, autenticidad e integridad de los elementos materiales de prueba recolectados y analizados, asegurando con ello que pertenecen al caso investigado, sin que puedan sufrir alteraciones, modificaciones o sustracciones desde su inicio hasta la culminación del proceso. La cadena puede incluir una cadena de frío, si el indicio colectado lo requiere, sin embargo, la cadena de frío es más utilizada cuando se trata con indicios como sangre con anticoagulante, sueros, tejidos biológicos y otro tipo de indicios que no son comúnmente utilizados para la detección de semen y espermatozoides o en la extracción de ADN. Se considera que un elemento material de prueba se encuentra bajo custodia, cuando este se halla bajo posesión y observación de una persona idónea,

guardada en un lugar seguro y accesible solo a personas autorizadas o con un permiso especial (Milena, 2009).

La cadena de custodia puede dividirse en procesal y documental. La cadena de custodia documental es el escrito que contiene la información sobre las características del indicio al que pertenece, incluyendo una descripción del mismo, datos de la fiscalía o juzgado que levanta el indicio y/o solicita su análisis, así como el sello y firma de todas las personas que han tenido posesión de éste, ya sea para su transporte, análisis o almacenamiento. Los datos consignados en dicha cadena deben coincidir con los descritos en el sobre de embalaje así como con las características físicas del indicio, el sobre de embalaje también debe ser sellado y firmado por las personas que entran en contacto con el indicio y aparecen en la cadena de custodia. Cuando se hace referencia a la cadena de custodia procesal se refiere al marcaje que realizan los peritos que tienen contacto con el indicio trabajado, y este consiste en colocar las iniciales del nombre de la persona que analiza en un área del indicio que no afecte cualquier análisis que pueda realizarse sobre el mismo (Milena, 2009).

### **C. Características del semen**

El semen es una mezcla viscosa de células, aminoácidos, azúcares, sales, iones y otros componentes orgánicos e inorgánicos en cuya elaboración participan principalmente la vesícula seminal, la glándula prostática, la glándula de Cowper y los testículos. Una eyaculación típica libera entre 2 y 5 mL de fluido seminal y espermatozoides. Estos son células especializadas, flageladas y con una morfología peculiar. Están constituidos por tres regiones: cabeza, cuello y cola, suelen medir entre 50 y 55  $\mu\text{m}$ , y al ser observados al microscopio se distinguen básicamente la cabeza y la cola. La cabeza tiene forma oval y aplanada, con unas dimensiones de 4,5  $\mu\text{m}$  de largo x 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho x 1,5  $\mu\text{m}$  de grosor. Su número puede variar entre 50 y 150 millones por mililitro de eyaculado, con una media de unos 100 millones en individuos normospermos. (Li, 2008, 115; Prieto, 2007).

Una muestra típica de semen contiene un 60% de fluido vesical, varias proteínas son secretadas por las vesículas seminales, las cuales juegan un papel en la densidad del eyaculado. Adicionalmente, el fluido de la vesícula seminal contiene flavina, que ocasiona que el semen florezca bajo una luz

ultravioleta. El fluido prostático representa aproximadamente el 30% del eyaculado total, estas secreciones contienen altas concentraciones de fosfatasa ácida y antígeno prostático específico (PSA o P-30). Estos son usados como marcadores para la identificación de semen en los laboratorios forenses (Li, 2008).

Las características del semen varían no sólo entre individuos, sino también dentro del mismo individuo según la edad o entre distintos eyaculados. Algunas enfermedades, condiciones genéticas, el abuso de alcohol y drogas, la exposición a determinados agentes químicos y acciones quirúrgicas pueden reducir drásticamente el número de espermatozoides en el eyaculado – oligozoospermia- e incluso provocar su ausencia –azoospermia- (Prieto, 2007).

Aún en casos donde no se observen espermatozoides al microscopio, es pertinente realizar la extracción de ADN de indicios en los cuales se sospecha la presencia de fluidos corporales, ya que existen otros elementos en el semen que pueden contener ADN, tales como leucocitos y células epiteliales del tracto urinario, células uretrales y prostáticas aunque en número mucho menor. Así, si en un individuo normospermo se espera encontrar unos 450 µg de ADN/ml de eyaculado, en un individuo azoospermico es factible detectar unos 30 µg, esto es, sólo un 6.3% de lo normal (Prieto, 2007).

#### **D. Detección de semen y espermatozoides**

En el año de 1826 quedó registrado uno de los primeros esfuerzos para identificar la presencia de semen en una prenda, cuando Ollivier d'Angers y Barruel reportaron un caso en el que fueron consultados. El sospechoso afirmaba que unas manchas encontradas en su ropa fueron hechas por carne cruda de animal. Los expertos examinaron las áreas de la ropa junto con otros controles, y compararon su respectiva humectabilidad con agua, la naturaleza y color del extracto acuoso, y el comportamiento del extracto en una solución de alcohol absoluto. El extracto tenía un olor espermático, era alcalino, y sus restos al secarse era pegajosos. Por lo que concluyeron que la mancha no pudo haber sido causada por grasa animal, y que se trataba de una mancha de semen (Gaensslen, 1983).

Orfila, uno de los médicos forenses más respetados de la época, reportó 1827 una serie de métodos de análisis químico para la identificación de fluido

seminal. Los métodos que desarrolló se basaban en la apariencia de las manchas cambios en el color y consistencia al ser sometidos al calor e inmersión en agua, el olor emitido al humedecer la mancha, y el comportamiento del extracto acuoso frente al tratamiento con diferentes agentes químicos. Las manchas de semen eran comparadas bajo estos criterios con descargas vaginales, con moco nasal y manchas de saliva. Orfila no tenía demasiada confianza en los métodos por microscopía y opinaba que debían utilizarse siempre métodos químicos para la identificación de las manchas. Devergie, en 1839, encontró que se podían localizar espermatozoides en el canal uretral de la víctima, a través de un examen microscópico. Notó que había encontrado espermatozoides en manchas con 10 meses de antigüedad y que la confirmación a través de la detección con espermatozoides era más certera que los métodos químicos utilizados para la identificación de semen (Gaensslen, 1983).

Sin embargo, no fue hasta 1839 cuando HL Bayard publicó procedimientos confiables para la detección espermatozoides por microscopía, y fue en 1897 cuando el Dr. W. F. Whitney desarrolló el método denominado tinción de Árbol de Navidad, método actualmente utilizado en INACIF (Gaensslen, 1983).

La mayoría de los métodos químicos utilizados inicialmente fueron poco a poco abandonados por la mayoría de investigadores, y la generalidad empezó a basar sus estudios en la microscopía. Posteriormente surgieron nuevos métodos bioquímicos para la detección de semen, y se empezó a utilizar la enzima fosfatasa ácida, presente en gran concentración en el semen, en relación con otros fluidos corporales. Esta enzima fue reportada por primera vez por Kutscher y Wohlbergs en 1935, sin embargo, Lundquist en 1945 le dio aplicación forense. También se utilizaron otras metodologías para detectar manchas de semen; Ito, en 1927, reportó que numerosos fluidos biológicos, incluidas las manchas de semen, florecían al ser sometidos a luz ultravioleta. Desde ese entonces muchos autores han publicado artículos al respecto y muchos laboratorios utilizan esa metodología de rutina (Federal Bureau of Investigation 1983; Gaensslen, 1983).

Posteriormente, surgieron métodos inmunológicos para detección de semen en diferentes superficies, inicialmente se utilizaron reacciones de precipitación, algunas reacciones de formación de cristales, y finalmente los utilizados

actualmente que se basan en la inmunocromatografía. Este último método es el utilizado para detección de la proteína seminal P-30, que fue identificada por Sensabaugh en 1978, y se bautizó en un principio en función de su peso molecular -30 000 daltons- (Prieto, 2007).

En la actualidad se utilizan una combinación de métodos bioquímicos, inmunológicos y microscópicos para la detección e identificación de semen en cualquier superficie, el INACIF utiliza las pruebas de fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 y tinción de árbol de Navidad.

### **1. Fosfatasa ácida**

Es una enzima que cataliza la hidrólisis de ciertos fosfatos orgánicos. Se encuentra presente en una variedad de tejidos humanos, así como también en animales y plantas. Sin embargo, las altas concentraciones en que se encuentra en el plasma seminal suponen un rasgo característico. Es secretada por las células epiteliales de la glándula prostática en grandes cantidades desde la pubertad hasta aproximadamente los 40 años, edad a partir de la cual decrece gradualmente la cantidad secretada. No se ha encontrado ninguna relación entre los niveles de enzima fosfatasa ácida (FA) y el número de espermatozoides, ni se han encontrado variaciones en los niveles de FA entre individuos normospermos e individuos clínicamente infértiles o vasectomizados (Prieto, 2007).

En un estudio citado por Prieto, V., en el 2007, se intentó establecer la capacidad del test de actividad de FA como test presuntivo de semen en extractos de manchas, su valor predictivo en la respuesta negativa se fijó en un 99.4% y el valor predictivo del resultado positivo fue del 69%, lo que significa que de cada 100 extractos que mostraron actividad FA, 31 fueron falsos positivos. Los datos muestran que se trata de una prueba más sensible que específica, característica deseable para cualquier técnica de tamizaje o mapeo (Prieto, 2007).

La diversidad de tejidos y especies en donde se encuentra presente esta enzima hace que los falsos positivos para determinar la presencia de semen sean elevados. Las diferentes isoenzimas de FA localizadas en tejidos humanos no son inmunológicamente distinguibles, aunque sí lo son

en su grado de sialización, propiedad que permitía caracterizarlas por técnicas de isoelectroenfoque en función de su punto isoeléctrico. Esta técnica era utilizada para confirmar la presencia de FA de origen prostático, y en la actualidad ha sido sustituida por la detección del antígeno prostático específico o P-30. Por tal razón la mayoría de expertos no consideran suficiente la determinación de fosfatasa ácida para reportar la presencia de semen, Hauck y Lëithof en 1959 realizaron un estudio al respecto y determinaron que un buen número de materiales de origen vegetal contenía valores elevados de FA (Gaensslen, 1983; Prieto, V. 2007).

Para determinar la presencia de esta enzima se utiliza un método colorimétrico, basado en la capacidad de la enzima de hidrolizar una variedad de esteres de fosfato, catalizando la salida del grupo fosfato del sustrato. Subsecuentemente se une a una sal de diazonio que resulta en la formación de un precipitado insoluble coloreado a expensas de la actividad de la FA. Para lograr mejorar la especificidad de la prueba y evitar que isoenzimas como las presentes en secreciones vaginales interfieran en la prueba, pueden utilizarse sustratos que son más rápidamente degradados por las isoenzimas prostáticas y más lentamente por otros tipos. Entre estos sustratos se encuentran el  $\alpha$ -naftil fosfato y timolftaleína monofosfato, que son más específicos para la FA prostática que el fenil fosfato y 4-nitrofenil fosfato (Gaensslen, 1983; Li, 2008).

El método más común en el área forense es el uso de  $\alpha$ -naftil fosfato como sustrato unido con Brentamina. La FA prostática es soluble en agua, por lo tanto, un hisopo humedecido o una pieza de papel filtro puede ser utilizado para transferir una pequeña cantidad de la muestra a través de ejercer brevemente presión sobre el área donde se sospecha que existe una mancha de semen. Se agrega el reactivo al hisopo o papel filtro, si se observa una coloración purpura en un tiempo menor a un minuto, se considera como resultado positivo para la presencia presuntiva de semen. Reacciones que den positivas luego de haber transcurrido un minuto pueden deberse a la actividad de fosfatasa ácida no prostática (Gaensslen, 1983; Li, 2008).

La vida media de la FA activa a 37°C es de seis meses. Sin embargo, la vida media disminuye si ésta es almacenada en ambientes húmedos. Puede detectarse la actividad de la FA de manchas de semen secas almacenadas a 20°C hasta luego de un año. El tiempo aproximado para la detección exitosa de la FA es de 48 horas después del contacto sexual, algunos autores reportan que se ha detectado actividad de FA, posterior a los tres días del coito. Existen bajos niveles de FA prostática en el suero de hombres saludables (Li, 2008; Quispe, Tarifa, Solíz, Sierra, 2010).

## **2. Proteína Seminal P-30**

El antígeno prostático específico (PSA) también conocido como proteína seminal P-30, fue descrito por primera vez en 1971 por Hara y colaboradores, ellos la llamaron inicialmente  $\gamma$ -seminoproteína. Li y Beling describieron lo que probablemente era la misma proteína y llamándola E1 en 1973. Sin embargo, fue en el año de 1978 que Graves desarrolló un método electroforético para su análisis a partir de manchas de semen. Graves, y colaboradores, estudiaron esta proteína ampliamente y su trabajo fue publicado como un complemento de su tesis de doctorado en 1985. Anticuerpos contra la proteína rápidamente se utilizaron en el área forense para la detección de semen (Laux, D.L., Tambasco, A.J. y Bezinger E.A s.f.).

La P-30 es una glicoproteína sializada de peso molecular de 30,000 Daltons que se origina en la próstata, por lo que la vasectomía no afecta su presencia en el líquido seminal. El rango de concentración en fluidos seminales es de 0.5 a 3 mg PSA/ml (Hochmeister, 1999).

Inicialmente se creía que se trataba de una proteína específica del semen, sin embargo, se ha determinado que se puede encontrar en múltiples tejidos, incluyendo las mamas, tumores, glándulas periuretrales, leche materna, líquido amniótico, orina femenina y el endometrio. No se ha detectado la presencia de P-30 en fluidos vaginales. Tampoco se ha identificado su presencia en el semen de otras especies animales domésticas (carnero, toro, cerdo, gato), aunque si se encuentra en primates tales como el orangután y macaco en rangos de concentración semejantes al humano, si bien en estas especies la actividad fosfatasa

ácida es extremadamente baja comparada con la humana (Breul, 1994; Clements, 1994; Graves, 1985; Prieto, V. 2007; Yu, 1994).

Entre los ensayos inmunocromatográficos para la detección de P-30 que se comercializan, se encuentran pruebas como PSA-check-1 (VED-LAB, Alencon); Seratec® PSA Semiquant (Seratec Diagnostica, Göttingen); y One Step ABACard PSA® (Abacus Diagnostics, California). En el caso de ABACard PSA, utiliza anticuerpos monoclonales antiP30 humanos que se unen al antígeno prostático específico (P30) formando un complejo antígeno-anticuerpo. El límite inferior de detección es de 4 ng/mL, por lo que una muestra que contenga una cantidad igual o superior, es evidenciado por la prueba, determinando un resultado positivo. (Benton, Donahue y Valdez, 1998; Li, 2008, 125; Kristaly y Smith, 1999).

### **3. Tinción de árbol de navidad**

Los espermatozoides tienen tres diferentes regiones: cabeza; cuello y cola. La cabeza es aplanada y elíptica contiene el núcleo con cromosomas empacados densamente. La punta de la cabeza se encuentra recubierta por una membrana que contiene enzimas esenciales para la fertilización, tales como hialuronidasas y acrosina que rompen la membrana externa del óvulo. Un cuello corto une la parte media con la cabeza, este cuello contiene los dos centriolos del espermatozoide original. Las mitocondrias en la parte media se encuentran arregladas de forma espiral alrededor de microtúbulos, la actividad de estas mitocondrias es proveer el adenosín-trifosfato (ATP) necesario para el movimiento de la cola. Constituyen la única célula flagelar del ser humano, que le permite un movimiento complejo en forma de sacacorchos. Estas células también se caracterizan porque en su estado maduro carecen de retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas y otras organelas intracelulares. Por tal razón estas células tienen menor masa y tamaño, además no contienen glicógeno ni otras reservas de energía, por lo que absorbe nutrientes de los fluidos circundantes, principalmente fructosa (Behre y Nieschlag, 2000; Martini y Frederic, 2005).

Tradicionalmente la observación al microscopio de espermatozoides, era considerada la prueba de confirmación de presencia de semen en una muestra analizada. En la actualidad un análisis de proteína seminal P-30

con resultado positivo, es considerado confirmatorio de presencia de semen aún en la ausencia de espermatozoides. Existe diversidad de criterios respecto a la supervivencia de espermatozoides, sin embargo, son considerados el componente seminal que puede detectarse a más largo plazo. Se puede aceptar, en personas vivas y de forma general un período máximo de 7 días para detectar cabezas de espermatozoides en vagina, dos o tres días en ano o recto y 24 horas en boca (Behre y Nieschlag, 2000; Martini y Frederic, 2005; Castro, s.f.).

Frecuentemente se observan espermatozoides intactos (con cola), en vagina dentro de las 24 horas siguientes al acto sexual, pero rara vez se encuentran en boca, ano o recto tras las 5 horas de los hechos. Estos datos se ven afectados por una diversidad de factores imposibles de controlar, lo que ocasiona variabilidad en los datos mencionados. En prendas de vestir y otras superficies, absorbentes almacenadas en ambientes secos, los espermatozoides pueden permanecer por décadas (Prieto, V. 2007; Castro, s.f.).

Existen diferentes tinciones utilizadas para teñir espermatozoides en el área forense, la tinción de árbol de navidad es una de las más difundidas y aceptadas por la comunidad científica forense. Esta tinción utiliza los colorantes rojo rápido nuclear y picro índigo carmín. La cabeza se tiñe de color rosado fuerte a rojo y el acrosoma se tiñe rosado pálido. La parte media se tiñe de una coloración que va de rojo fuerte a lila debido al colorante rojo rápido nuclear. La cola se teñirá de una coloración verde debido a la acción del picro índigo carmín. También se tiñen las células epiteliales presentes, observándose como estructuras romboides con núcleos de color rosado/rojo (Serological Reserach Institute, 2009; Wheeler y Wilson, 2008).

## **E. El ADN y los análisis genéticos**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polinucleótido constituido por dos cadenas antiparalelas de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente, dispuestos de forma complementaria y adoptando una estructura enrollada de doble hélice dextrógira. Esta molécula es necesaria para transferir la información genética a las siguientes generaciones. Todas las células del cuerpo tienen ADN excepto los glóbulos rojos que son anucleados.

Los ácidos nucleicos incluyendo el ADN están compuestos por nucleótidos, estos están formados a su vez por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. Existen cuatro bases nitrogenadas que pueden estar presentes en el ADN estas son: Adenina (A); Timina (T); Citosina (C); y Guanina (G) formando los deoxinucleótidos que son denominados por las mismas siglas. Estas bases nitrogenadas se unen entre sí de forma complementaria a través de puentes de hidrogeno, A y T forman puentes con dos uniones, mientras que G y C forman tres puentes de hidrogeno. A estas uniones específicas entre deoxinucleótidos se les denominan pares de bases (pb). El ADN es una sucesión concatenada de los cuatro deoxinucleótidos mencionados: A, C, G y T. El orden específico en que estos se encuentra se denomina secuencia, y estas secuencias son las que definen el tipo de aminoácidos y proteínas que se van a sintetizar en la célula, definiendo así el tipo de tejidos y estructuras que formarán (Inman y Rudin, 1997; Li, 2008).

Las secuencias son determinadas designando los extremos 5' y 3'. Los números provienen de la estructura química del ADN y se refiere a la posición de los átomos de carbono en el anillo del azúcar que conforman la columna vertebral del ADN. Normalmente estas secuencias son escritas y leídas en dirección 5' a 3', y de esta forma también son leídas por la ADN polimerasa cuando sucede la replicación. Existen 6,000 millones de pb, que en el organismo se disponen de modo irregular en 23 pares de cromosomas que se encuentran en el interior del núcleo, 22 pares de cromosomas son denominados autosómicos, el par 23 está constituido por cromosomas que son denominados sexuales, ya que determinan el sexo de las personas. De este modo, el sexo femenino viene representado por dos cromosomas X (XX) y el masculino por un cromosoma X y otro Y (XY). Esto se debe a que tras la fecundación la mitad del ADN del cigoto procede del óvulo materno (que porta un cromosoma X) y la otra mitad procede del ADN del espermatozoide (que puede portar un cromosoma X o un cromosoma Y). Por lo tanto, es el espermatozoide el que determina el sexo del futuro individuo (Butler, 2005; Lorente, Alvarez, Entrala, Lopez-Munoz y Villanueva, 1998).

El cromosoma Y representa solamente el 2% del genoma humano, es uno de los cromosomas más pequeños. El 95% del cromosoma Y no recombina (no intercambia material genético) con el cromosoma X, por lo que se transmite de manera intacta de padre a hijo. Contiene aproximadamente 60 millones de pb

y puede dividirse en dos regiones, la región pseudo-autosómica región (PAR) y la región específica masculina del cromosoma Y (MSY). Se han utilizado regiones cortas repetidas en tándem (STR por sus siglas en inglés) del cromosoma Y polimórficos de la MSY para la identificación forense, estas regiones y sus loci son conocidos como haplotipos, ya que se trata de colecciones de alelos que están unidos inherentemente, debido a que no ocurren recombinaciones homólogas en la mayor parte del cromosoma Y (Butler, 2005; Inman y Rudin, 1997).

Esta característica hacen que a través del cromosoma Y puedan estudiarse linajes paternos y lo hace particularmente útil en los casos de violación donde se obtiene mezcla de perfiles genéticos, ya que obtener el perfil genético del cromosoma Y encontrado de los indicios provenientes de la violación, permitirá identificar ADN que proviene de una persona distinta a la víctima, si la víctima es de sexo femenino, o distinguir entre perfiles genéticos de personas de sexo masculino, siempre y cuando estas provengan de distinto linaje paterno (Burke y Terry 1990; Butler, 2005; Lorente, Alvarez, Entrala, Lopez-Munoz y Villanueva, 1998).

La mayoría de identificaciones humanas se realizan utilizando marcadores autosómicos y determinando el sexo de la persona. En genética forense se conoce como marcadores autosómicos a ciertas regiones de ADN para las cuales se han diseñado cebadores específicos, que permiten que estas regiones sean amplificadas e identificadas por análisis genéticos (Butler, 2005).

El ADN contiene regiones codificantes y no codificantes. Las regiones codificantes contienen información necesaria para la síntesis de proteínas de las células, también son conocidas como exones y representan solamente el 5% del genoma humano, mientras que las regiones no codificantes o intrones representan 95% restante (Butler, 2005).

Los marcadores diseñados para la identificación humana están dirigidos a estas regiones no codificantes. Los marcadores polimórficos son regiones de ADN que presentan un gran número de variantes, lo que permite diferenciar el ADN de distintos individuos cuando son analizados simultáneamente varios marcadores. La región del cromosoma o posición específica en un gen (puede utilizarse como marcador genético) es conocida como *locus*. A las distintas

variantes génicas que pueden aparecer en un locus cromosómico se les denominan alelos. Existen concesos entre los laboratorios forenses del mundo para analizar las mismas regiones del ADN, los marcadores son nombrados de acuerdo al gen en el que se encuentran, por ejemplo el marcador TH01 es un marcador diseñado a partir de regiones cortas repetidas en tándem y proviene del gen tirosina hidroxilasa localizado en el cromosoma 11. El "01" del TH01 se debe a que la región en cuestión se localiza en el intron 1 de dicho gen (Burke y Terry 1990; Butler, 2005; Inman y Rudin, 1997).

Actualmente los *loci* microsatélites son los de mayor utilidad en el campo de identificación genética. Se les denomina microsatelites a las secuencias de pares de bases consenso repetidas en tándem, que tienen entre 1 a 6 pb y se encuentran distribuidos por todo el genoma, tanto en regiones codificantes, como en no codificantes. Al igual que otras secuencias utilizadas previamente son altamente polimórficas. A este polimorfismo se le denomina STR (Butler, 2005).

## **F. Extracción de ADN**

La extracción de ADN tanto nuclear o mitocondrial conlleva la ruptura de la doble membrana lipídica citoplasmática, nuclear y/o mitocondrial para posibilitar la liberación del ADN que se encuentra en su interior. Los protocolos de extracción de ADN deben cumplir una doble función; la primera es extraer el ADN del núcleo o la mitocondria y finalmente purificarlo, que es conseguir eliminar al máximo la cantidad de contaminantes que puedan interferir en análisis posteriores. Existen varias metodologías de extracción de ADN, que se adecúan al tipo de evidencia biológica, tipo de sustratos y cantidad de evidencia recolectada. El método elegido es comúnmente aquel que brinde suficiente cantidad, buena calidad y alta pureza de ADN. Existen factores que pueden afectar la extracción de ADN, como material genético degradado, que puede ocasionar la falla del procedimiento; la baja pureza de ADN, que puede causar interferencias durante los pasos siguientes del análisis genético; la presencia de inhibidores de la polimerasa, pueden interferir en la amplificación de ADN. Otras consideraciones importantes al momento de elegir el protocolo de extracción adecuado para el tipo de muestras con el que se trabajará, son la adaptabilidad para automatización, simplicidad, riesgo de contaminación y costo efectividad. Los métodos de extracción utilizados con mayor frecuencia

son el de Chelex y el método de extracción orgánica (fenol-cloroformo), ambos tienen características que favorecen la extracción de cierto tipo de muestras (Inman y Rudin, 1997; Li, 2008).

### **1. Extracción de ADN a partir de indicios de referencia**

El indicio de referencia más común en Guatemala es la sangre fijada en papel FTA o papel filtro. El ADN se extrae a partir de los leucocitos. En promedio una persona saludable posee de 5.000 a 10.000 leucocitos por mililitro de sangre, por lo que incluso manchas muy pequeñas pueden contener suficientes células como para obtener la cantidad de ADN necesario para obtener perfiles genéticos. Las células epiteliales de la cavidad bucal, son el segundo tipo de indicio de referencia más común. La composición de saliva es básicamente agua, sales minerales y múltiples células en suspensión (de 100.000 a 400.000 células por mililitro). Una pequeña parte de las células procede de las glándulas secretoras y de sus conductos de secreción, no obstante, la mayoría son leucocitos y células de descamación del epitelio bucal y lingual -células que mueren y se quedan en la boca, o células que son arrancadas por los movimientos realizados al hablar y al masticar- (Lee, H., Gaensslen R., Bigbee, P. y Kearney, J., 1991).

El método de Chelex es el más recomendado para la extracción de ADN a partir de indicios de referencia. La resina de Chelex está compuesta de copolímeros de divinilbenceno estireno que contienen iones apareados iminodiacetato, estos actúan como grupos quelantes uniendo iones metálicos polivalentes como el magnesio. Al remover el magnesio de la reacción, las nucleasas quedan desactivadas, por lo que se conserva el ADN. Este método es más rápido, sencillo, económico y menos tóxico que el método orgánico, además de conllevar menos pasos lo que reduce la posibilidad de contaminación entre indicios. Sin embargo, este método tiene menor capacidad de purificación que otros, ya que se limita a bloquear el exceso de iones y no elimina otro tipo de moléculas, tales como enzimas y proteínas que pueden interferir en el análisis posterior. Su rendimiento también es menor en comparación a otros métodos. Estas características hacen que este método sea el más adecuado para extraer ADN de indicios que se han obtenido en condiciones controladas, que

cuentan con buena cantidad de ADN y no requieren mayor purificación (Butler, 2005; Inman y Rudin, 1997).

## **2. Extracción diferencial de ADN**

Generalmente los indicios que se recolectan en los delitos de violación sexual contienen una mezcla de fluidos biológicos que provienen tanto de la víctima como del (los) agresor (es). Las excepciones son los casos en que el agresor deja restos de semen u otras sustancias en superficies donde es poco probable que existan células de la víctima, tales como sábanas, toallas, colchas, algunas prendas de vestir, entre otros indicios. El objetivo del análisis es obtener el ADN del (los) agresor (es) a partir de fluidos biológicos detectados por métodos bioquímicos, inmunológicos o microscópicos; que pudiera contener alguno de los indicios recolectados. Para poder obtener perfiles genéticos independientes y bien diferenciados es necesario utilizar un método que permita diferenciar el ADN de las células espermáticas, del ADN de las células epiteliales de la víctima. La extracción diferencial es una modificación del método orgánico y es utilizado por múltiples laboratorios forenses incluyendo el del Federal Bureau of Investigation -FBI- (Butler, 2005; Marrakchi y Maibach, 2006).

Este tipo de extracción inicia con la ruptura de las células epiteliales provenientes de la víctima, esto se consigue incubando la muestra en una solución que contiene dodecilsulfato sódico (SDS) y proteinasa K. El SDS es un detergente tensoactivo iónico que desnaturaliza proteínas rompiendo sus enlaces no covalentes. Los núcleos de las células espermáticas se rompen con una mezcla de SDS, proteinasa K y ditioneitol (DTT). El DTT rompe los puentes disulfuro que conforman las membranas nucleares. La extracción diferencial se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergentes y proteinasa K en ausencia de un agente reductor (como el DTT), por lo que inicialmente se da la rotura de las células epiteliales, sin que se libere el ADN de los espermatozoides. La fase de la extracción del ADN de las células epiteliales sin DTT es la principal diferencia con el método de extracción orgánico convencional. Este tipo de extracción permite obtener finalmente una fracción femenina –ADN de la víctima- y una fracción masculina –ADN del agresor-. Sin embargo, en el caso de individuos azospérmicos o en indicios donde no detectan espermatozoides, generalmente se encontrará

una mezcla de perfiles genéticos entre la víctima y el agresor. También se encontrarán mezclas de perfiles en casos donde las células espermáticas se lisen junto a las células epiteliales, o donde se encuentre material genético de varias personas. (Butler, 2005; Gill, Jeffreys y Werrett, 1985; Li, 2008; Marrakchi y Maibach, 2006).

La menor capacidad de purificación y eliminación de interferentes e inhibidores por parte de la resina de Chelex, quedó evidenciada en los estudios realizados por Vuichard y colaboradores, y hace que el método orgánico sea el más utilizado para extraer ADN de muestras provenientes de indicios, que por lo general, presentan menor cantidad y calidad de ADN que los indicios de referencia obtenidas en condiciones óptimas y con materiales ideales para la conservación del mismo. Un estudio realizado por Greenspoon y colaboradores comparo kits comerciales de extracción de ADN con el método orgánico y el método de Chelex, demostrando que con la utilización de algunos métodos comerciales, puede haber pérdidas de hasta el 75% del ADN disponible en relación al recuperado con el método orgánico. En adición la extracción diferencial de ADN por el método orgánico permite una mayor discriminación entre el perfil genético de la víctima y el perfil del agresor. Otro factor importante a tomar en cuenta es que la estabilidad de las muestras extraídas por Chelex es de aproximadamente un año, mientras que el ADN extraído en la fase acuosa, obtenida a través del método orgánico, puede almacenarse por décadas (Greenspoon, Scarpetta, Drayton, Turek, 1998; Viuchard, Bottinelli, Cossu, Malik, Meier, Gehrig, Sulzer, Morerod, Castella, 2011).

#### **G. Cuantificación de ADN**

Luego del procedimiento de extracción de ADN de los indicios es necesario determinar la cantidad y calidad de ADN con que se cuenta para obtener perfiles genéticos. Esta cuantificación se realiza debido a que los procedimientos de electroforesis capilar funcionan mejor a ciertas concentraciones de ADN, por lo general con una concentración que oscile entre 1 a 2 ng de ADN por muestra se obtienen resultados óptimos. Por lo que la cuantificación de ADN permite conocer la cantidad de ADN con la que se contara luego de la amplificación de ADN a través de la PCR (Lorente, Alvarez, Entrala, Lopez-Munoz y Villanueva, 1998).

La importancia de la cuantificación se basa en que si existe demasiado ADN al momento de realizar la electroforesis capilar puede ser que el equipo utilizado, no diferencie plenamente los fragmentos de ADN amplificados y se observen alelos dobles o que estos no se han reconocidos por la metodología utilizada. Si la cantidad de ADN es demasiado baja pueden darse pérdidas alélicas o “drop-out” en algún marcador (que un alelo no sea detectado), debido a que no pudo ser amplificado correctamente durante la reacción de PCR (Butler, 2005).

Existen diferentes metodologías para cuantificar el ADN, las más utilizadas son la cuantificación mediante electroforesis en geles de agarosa, cuantificación mediante la técnica “Slot-Blot” y la cuantificación por PCR en tiempo real (Butler, 2005; Lorente, Alvarez, Entrala, Lopez-Munoz y Villanueva, 1998).

El método de cuantificación por PCR en tiempo real utilizado por INACIF brinda varias ventajas, ya que determina la cantidad y calidad de ADN presente y además permite determinar la presencia de inhibidores de la reacción; ADN altamente degradado; cantidad de ADN insuficiente o una combinación de estos factores, por lo que puede dar información importante sobre la estrategia a seguir para lograr obtener ADN con la cantidad y calidad necesaria. La reacción de PCR se describe con detalle en el inciso H; sin embargo, cabe mencionar que el objetivo de esta reacción es lograr producir múltiples copias del ADN presente en la muestra analizada. Esto se logra a través de varios ciclos en los que la enzima ADN polimerasa replica regiones específicas del ADN de interés, aumentando exponencialmente la cantidad de ADN presente (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, y Losick, 2004).

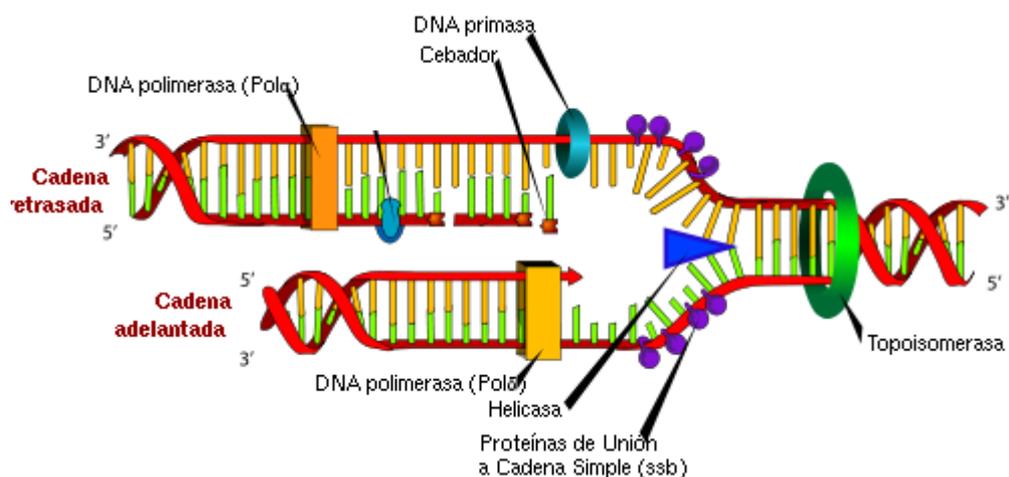
La PCR en tiempo real va cuantificando la cantidad de ADN que se va produciendo luego de cada ciclo, esto se debe a que se utilizan como cebadores (comúnmente conocidos como primers), oligonucleótidos marcados con fluorocromos, que se unen a la secuencia de ADN que se desea amplificar. Cuando estos fluorocromos son separados de los oligonucleótidos pasan a su estado excitado y actúan como reporteros durante la replicación del ADN. Los equipos de PCR en tiempo real van analizando los cambios de señal generados durante las tres fases de ciclo en las que se da la reacción, estas fases y la reacción de PCR en tiempo real son descritas en la sección I. Si se

detecta fluorescencia en menos ciclos la cantidad de ADN presente es mayor (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, y Losick, 2004).

## H. Amplificación de ADN por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática en la que regiones específicas del ADN son replicadas en varios ciclos, con el fin de obtener múltiples copias de la región de interés. La técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis en el año 1989, inspirada a partir del proceso natural de replicación de ADN, por lo tanto la PCR es un proceso de síntesis “in vitro” que utiliza como patrón el ADN de la muestra analizada, además de contar con oligonucleótidos sintéticos de unos 15 a 30 nucleótidos que son complementarios de la región que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos conocidos comúnmente como primers actúan como cebadores para la unión de la enzima Taq Polimerasa a la región de interés, esta enzima debe su nombre a la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que posee la capacidad de vivir a temperaturas elevadas de 79 a 85°C. Las enzimas polimerasas tienen la función de añadir deoxinucleótidos en una secuencia determinada por una cadena lineal de ADN que sirve de molde, formando pares de bases (ADN de doble cadena), según los fundamentos descritos en la sección E (A se une a T y G se une a C), aumentando así las copias de ADN que se tienen en una muestra, como se muestra en la figura 1 (Butler, 2005).

**Figura No. 1**



Tomado de replicación del ADN, recuperado de: [www. http://100ciasaldia.blogspot.com/](http://100ciasaldia.blogspot.com/)

El fin de la PCR es aumentar la cantidad de ADN presente en una muestra, por lo que se llevan a cabo una serie de amplificaciones coordinadas en ciclos,

cada uno compuesto por tres etapas durante las cuales se someten las muestras a diferentes tiempos y temperaturas de incubación que favorecen distintos procesos (Butler; 2005).

La primera etapa se denomina desnaturalización, durante la cual las muestras se someten a una temperatura de 90 a 95°C, provocando la separación de la doble hebra de ADN. La segunda etapa es la hibridación comúnmente llamada “annealing” o de emparejamiento, en la cual se unen cebadores a las cadenas simples de ADN resultantes de la desnaturalización. Los cebadores son secuencias cortas de ADN, diseñadas específicamente para unirse a las regiones flanqueantes del ADN de interés. La unión de los cebadores a las cadenas de ADN es favorecida a ciertas temperaturas, determinadas por el tipo de cebadores a utilizar, sin embargo, generalmente estas se encuentran comprendidas entre 40 a 60°C (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell Gann, Levine, y Losick, 2004).

La etapa final de la PCR es la extensión, durante la cual la enzima Taq polimerasa incorpora deoxinucleótidos en el extremo 3' del cebador incorporado durante la fase de hibridación, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura ideal para la actividad de la enzima Taq polimerasa es 72°C, en la cual alcanza su máxima actividad. Para lograr los cambios de temperatura las muestras se colocan en un termociclador, equipo que fue diseñado específicamente para este tipo de reacción, y tiene la capacidad de realizar cambios de temperatura de forma rápida. Estos cambios de temperatura se realizan en forma de ciclos en los que se van repitiendo los procesos de desnaturalización, hibridación y extensión (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell Gann, Levine, y Losick, 2004).

#### **I. PCR en tiempo real**

La reacción de PCR en tiempo real fue descrita por primera vez por Higuchi y colaboradores, a principio de los años 1990, en ocasiones se refiere a esta reacción como PCR cuantitativa o análisis cinético, debido a que se analiza ciclo a ciclo los cambios en la señal de fluorescencia emitida como resultado de la amplificación de una secuencia blanco de ADN, durante la PCR (Butler, 2005).

Generalmente los cebadores utilizados en los kits de PCR en tiempo real, utilizados en ciencias forenses, vienen marcados con fluorocromos, y están diseñados para unirse a regiones específicas del ADN humano. Los fluorocromos son conocidos como reporteros (R) y se encuentran unidos al extremo 5'. Mientras en el extremo 3', se encuentra unido un tipo de tinte, conocido como extintor, denominado Q por sus siglas en inglés (quencher). Al inicio del análisis R está en proximidad con Q, por lo que se producirá poca o nula fluorescencia, debido a la supresión de la fluorescencia del reportero debido a la transferencia de energía entre R y Q, es decir Q absorbe la fluorescencia emitida por R (Bustin, 2005; Butler, 2005).

Durante la polimerización (adición de deoxinucleótidos a la cadena molde), la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa utilizada en la PCR en tiempo real, desplaza los oligonucleótidos (cebadores) unidos al extremo 5' de la secuencia blanco, por lo que se libera el R, y al no estar en proximidad de Q, emite fluorescencia aumentando la señal captada por el equipo de PCR en tiempo real. Por tal razón la cantidad de fluorescencia detectada por el equipo, será proporcional a las copias de ADN que sean producidas durante la PCR (Butler, 2005).

El equipo de PCR es un termociclador con la capacidad de detectar la emisión de fluorescencia. Además se encuentra conectado a una computadora, que cuenta con un programa conocido como SDS 7500®, que usa un parámetro llamado umbral o threshold, para definir el nivel basal de fluorescencia detectable, basado en el número de ciclos requeridos para cruzar el umbral, el programa puede comparar las muestras evaluadas cuantitativamente: una muestra con mayor número de copias inicial cruzará el umbral más temprano que una muestra con un nivel de copias inferior. Además, el programa utiliza un parámetro conocido como umbral de ciclo (Ct por sus siglas en inglés). El Ct para una determinada muestra corresponde al ciclo de la PCR en que se cruza el umbral. El valor de Ct depende de la cantidad de ADN blanco, y de la eficiencia de la amplificación (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, y Losick, 2004).

Para determinar la cantidad de ADN en un análisis de PCR en tiempo real, se utilizan 8 estándares (en duplicado), con una concentración de ADN conocida. El programa va a determinar el valor de Ct de los 8 estándares (en

duplicado), comparándolos contra la concentración de ADN esperada (según la concentración inicial de cada uno), generando una curva estándar. Basado en dicha curva estándar, el programa va a utilizar el valor de Ct de las muestras desconocidas para determinar la cantidad de ADN presente, a través de una regresión lineal (Bustin, 2005; Butler, 2005).

La curva estándar muestra la cantidad de ADN según el número de ciclos de PCR que han transcurrido, y evidencia a la fase de la PCR en la que se encuentra el análisis. Las fases de la PCR, son tres: fase geométrica o amplificación exponencial, fase lineal o amplificación lineal y la fase horizontal (Bustin, 2005).

La fase geométrica es la primera del PCR, durante ésta, la señal es detectada y aumenta de manera directamente proporcional al producto del PCR, mientras la amplificación sucede de manera eficiente y constante, debido a que la cantidad de cebadores, deoxinucleotidos, polimerasas y demás componentes de la PCR, se encuentran en cantidades óptimas, por lo que se hay un alto grado de precisión en cuanto al producto de la PCR. Típicamente, el equipo es lo suficientemente sensible para detectar fluorescencia después de 3 ciclos de la fase geométrica, asumiendo que las condiciones de PCR están optimizadas. Cuando la concentración del ADN blanco alcanza  $10^{-6}$  M, la acumulación exponencial del producto de PCR se detiene (Bustin, 2005; Butler, 2005).

La segunda fase de la cuantificación es la fase lineal, durante la cual la inclinación de la curva de amplificación disminuye constantemente, principalmente por la disminución de la cantidad de cebadores disponibles para la reacción, lo que ocasiona que la eficiencia de amplificación disminuya. Es denominada lineal debido a que la amplificación se aproxima a la progresión aritmética, contrario al aumento geométrico inicial (Butler, 2005).

La tercera y última fase de la PCR se denomina fase horizontal, durante esta fase la PCR se detiene y la señal de fluorescencia permanece relativamente constante, y la concentración del blanco alcanza aproximadamente  $10^{-7}$  M (Butler, 2005).

## J. Ensayos para identificación humana

Como se menciona en la sección E, los análisis genéticos utilizan marcadores genéticos para la identificación humana. Existen diversas marcas comerciales que han diseñado análisis que permiten la identificación de varios marcadores en una misma reacción, comúnmente denominados análisis multiplex. El Combined DNA Index System (CODIS) del FBI recomienda el uso de por lo menos 13 marcadores para identificación humana. Los trece marcadores avalados por el CODIS son los siguientes: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11. También incluyen el marcador Amelogenina que determina el género de la persona. El CODIS del FBI es un programa diseñado en Estados Unidos en asociación con laboratorios criminalísticos de todo el mundo, para fomentar el intercambio y la comparación de las pruebas forenses de ADN a partir de la investigación de delitos violentos. La elección de dichos marcadores por parte del CODIS, se basa en que son marcadores que son fácilmente amplificables, son sensibles a concentraciones bajas de ADN y aportan un alto poder de discriminación entre individuos, ya que son altamente polimórficos (Mayntz-Press, Ballantyne, 2007; McLaren, 2007).

En Guatemala las dos marcas de mayor distribución en el mercado forense en materia de cuantificación y amplificación de ADN para identificación humana, son Promega y Applied Biosystems. Para amplificación de ADN nuclear existen los kits PowerPlex® 16 System (Promega) e Identifiler® Plus Kit (Applied Biosystem), ambos son ensayos multiplex, que analizan simultáneamente en la misma reacción 16 marcadores distintos, incluyendo los 13 marcadores avalados por el CODIS del FBI para identificación humana. El kit Identifiler® Plus incluye además los marcadores D2S1338 y D19S433. El kit Powerplex® 16 System agrega los marcadores Penta E y Penta D a los marcadores recomendados por el CODIS (Burley, s.f.; Forensics DNA Diagnostic Center, 2008; Mayntz-Press, Ballantyne, 2007; McLaren, 2007).

La sensibilidad del Kit de Identifiler® Plus reportada en un estudio realizado por Lynne Burley es de 1ng a 31.25pg de ADN, mientras un estudio patrocinado realizado por Robert McLaren de la corporación Promega, comparo el sistema Powerplex® 16 con Indentifiler® System (versión anterior a Identifiler® Plus) determinando una sensibilidad de 62.5pg de ADN para

Powerplex®, y reportó que con esa cantidad de ADN Identifiler® solo producía perfiles parciales (había ausencia de alelos para algunos marcadores). Por otro lado el precio en el mercado del kit de Identifiler® Plus es aproximadamente Q33,000, para 200 reacciones, y el kit de 100 reacciones de Powerplex® tiene un precio aproximado de Q27,000 (Burley, s.f.; Forensics DNA Diagnostic Center, 2008; Mayntz-Press, Ballantyne, 2007; McLaren, 2007).

INACIF utiliza actualmente el kit de Identifiler Plus®, con el que se han obtenido excelentes resultados desde el año 2010. Este kit cuenta con varias ventajas, una de las principales radica, en la existencia de estudios que determinaron la frecuencia alélica en Guatemala para los marcadores utilizados por el kit, lo que es de gran utilidad para los análisis estadísticos, detallados en la sección L. En adición, los cebadores utilizados para los marcadores mencionados, son marcados con fluorocromos para que puedan diferenciarse un locus de otro durante la electroforesis. El kit también incluye una enzima polimerasa “Hot Start” que inicia su actividad al ser sometida por 10 minutos a una temperatura de 95 a 100°C, y finalmente cuentan con deoxirribonucleótidos trifosfato –dNTPs-. Para la detección del ADN cromosoma Y INACIF utiliza el kit Y-filer, que identifica 16 loci: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y-GATA H4, DYS437, DYS438 y DYS44. Como se menciono previamente, el análisis del cromosoma Y es de utilidad para determinar relación biológica por vía paterna (Burley, s.f.; Forensics DNA Diagnostic Center, 2008; Mayntz-Press, Ballantyne, 2007; McLaren, 2007).

#### **K. Obtención y comparación de perfiles genéticos por electroforesis capilar**

Luego de la amplificación se obtienen varias copias de los fragmentos de ADN de interés. Hoy en día la técnica de electroforesis es la más utilizada para identificar y tipificar dichos fragmentos. Esta técnica se basa en el proceso físico mediante el cual partículas cargadas migran a través de un determinado soporte cuando son sometidos a un campo eléctrico. Los grupos fosfato del ADN le brindan una carga negativa, por lo que dentro del campo eléctrico, tenderá a moverse hacia el ánodo, haciéndolo de manera más rápida los fragmentos más pequeños, quedando rezagados los más grandes. Los métodos de electroforesis más utilizados en genética forense son: electroforesis en geles

de agarosa, electroforesis en geles de acrilamida; y electroforesis capilar. Este último es utilizado por la mayoría de laboratorios de genética forense, incluyendo el de INACIF, debido a que brinda varias ventajas y supera varios de los problemas de los métodos convencionales (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell Gann, Levine, y Losick, 2004).

La electroforesis capilar (CE), utiliza capilares de sílica que miden entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen una longitud de 25 a 75 cm. El medio de soporte o de separación es un polímero, que es inyectado en los capilares. Las características de estos capilares hacen que se genere mayor cantidad de calor y se puedan aplicar cantidades mayores de energía, pudiendo estar la diferencia del campo eléctrico entre 10 a 100 veces más fuerte con la CE, por lo que se obtienen resultados rápidamente (Butler, 2005).

Antes de correr cada muestra se inyecta el polímero en el arreglo de capilares y la detección de las muestras se realiza automáticamente por el analizador genético utilizando un laser colocado cerca del final del capilar. En el mercado existen diferentes tipos de analizadores genéticos para electroforesis capilar, uno de ellos es el ABI Prism® 310 de Applied Biosystems. El arreglo del capilar en el que se lleva a cabo la electroforesis se encuentra cubierto por una membrana opaca excepto por una pequeña zona denominada “ventana del capilar” la cual es atravesada por el láser y permite que las muestras sean excitadas a su paso por la misma. Estas emisiones de fluorescencia son recogidas por una cámara incorporada en el equipo denominada cámara CCD (Butler, 2005; Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, y Losick, 2004).

El equipo también incluye un software que recoge datos de ciertas áreas en la cámara CCD para recoger exclusivamente las emisiones procedentes del grupo de fluorocromos que se están utilizando. Por tanto, las emisiones recogidas provienen de los fluorocromos con los se han marcado los cebadores de los fragmentos de ADN que se desean amplificar. La utilización de más fluorocromos, es de gran utilidad en el caso de la PCR multiplex, por que evita el solapamiento en aquellos marcadores de ADN de tamaños similares (Butler, 2005).

Un ejemplo de este tipo de casos se da con el marcador D8S1179 que posee un rango de tamaño comprendido entre 128 y 168 pb mientras que en el D5S818 este rango oscila entre 135 y 171 pb por lo que habría un solapamiento entre los fragmentos comprendidos entre 135 y 168 pb. En un sistema de

electroforesis en geles de acrilamida estos dos marcadores no podrían ser amplificados conjuntamente por que sería imposible distinguir entre los fragmentos de ambos marcadores que estuvieran dentro del rango común; en cambio si los fragmentos van a ser sometidos a electroforesis capilar fluorescente, es posible marcar cada pareja de primers con un fluorocromo distinto, por lo que se emitirá una fluorescencia a diferente longitud de onda y podrán diferenciarse aunque los fragmentos tengan tamaños solapantes (Butler, 2005; Lorente, Alvarez, Entrala, Lopez-Munoz y Villanueva, 1998).

Una vez recogidos los datos de las emisiones producidas por los diferentes fluorocromos, son enviados a una computadora conectada al analizador, y a través de una serie de programas informáticos, son convertidos en electroferogramas. Estos electroferogramas muestran los 16 marcadores analizados y sus respectivos alelos que aparecen como picos, a los que se les asigna un valor numérico, de acuerdo a la cantidad de pares de bases que presentan los fragmentos de ADN amplificados (figura 2). Este tipo de representación gráfica facilita la interpretación (descrita en la sección M), haciéndola más sencilla y práctica en relación a la realizada con la electroforesis convencional. (Butler, 2005; Lorente, Alvarez, Entrala, Lopez-Munoz y Villanueva, 1998; Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, y Losick, 2004).

**Figura No. 2**



Electroferograma: 16 marcadores genéticos con sus diferentes variantes o alelos. Estos alelos son comparados con la evidencia recolectada para establecer si existe la relación (identificación, paternidad etc.) que presume el investigador. Tomado de: Butler, J., (2005). Forensic DNA Typing. Biology, Technology, And Genetics of STR markers.

## L. Análisis Estadístico

Los principios de Mendel se aplican en la herencia de los loci del ADN nuclear utilizado comúnmente en análisis forense. La frecuencia de alelos ( $p$ ) puede ser calculada directamente contando la cantidad de un tipo de alelo para determinado locus y dividirlo por el número total de alelos que pueden aparecer en una determinada población para ese locus. Existen diversos estudios que se han encargado de establecer las frecuencias alélicas para distintas razas humanas. En Guatemala en el año 2006 Martínez y colaboradores realizaron un estudio titulado *Guatemala Mestizo Population Data on 15 STR Loci (Identifiler® Kit)*, en el cual, se determinó la frecuencia alélica en 200 personas, para los 15 loci incluidos en el kit Identifiler®, enfocándose principalmente en la población mestiza residente en el país. Los datos de las frecuencias alélicas obtenidas en dicho estudio, son utilizados actualmente por INACIF para realizar los análisis estadísticos. La heterocigocidad es la proporción de alelos para un determinado locus, también puede verse como la proporción de individuos heterocigotos (que presentan dos alelos distintos por locus) y es calculada con la fórmula:

$$h = 1 - \sum p^2$$

En donde  $h$  es heterocigocidad y  $p$  es la frecuencia alélica para un locus homocigoto. La heterocigocidad de un locus muestreado en una población es una medida de la variación genética. Dicha heterocigocidad es directamente proporcional a la variación genética de una población (Li, 2008; Martínez, Martínez, Fernández, Entrala, Alvarez, Lorente, Budowle, Ovalle, 2006).

El poder de discriminación de los loci utilizados puede ser medido utilizando la probabilidad de coincidencia en una población ( $P_m$ ).  $P_m$  es definido como la probabilidad de tener genotipos coincidentes entre dos individuos elegidos al azar. Entre más bajo sea el valor de  $P_m$ , menor será la posibilidad de encontrar coincidencia entre dos individuos elegidos al azar. La fórmula para calcular el  $P_m$  es la siguiente:

$$P_m = \sum (p^2)^2 + \sum (2pq)^2$$

En donde  $p$  y  $q$  representan la frecuencia de dos alelos diferentes en una población, los valores de  $p$  y  $q$  se basan estudios poblacionales realizados previamente.  $P_m$  también puede ser usado para comparar el poder de

discriminación de diferentes loci, por lo que es comúnmente utilizado en el área forense, principalmente con STR's (Collins y Morton; Li, 2008).

En los casos de violación y asesinato se busca establecer la coincidencia entre dos o más perfiles genéticos obtenidos de distintas fuentes. El perfil genético de una escena del crimen puede coincidir con el de un sospechoso, debido a que el ADN de la escena proviene del sospechoso, o por que el sospechoso casualmente tiene el mismo perfil genético que el que encontrado en dicha escena. Por tal razón, los cálculos estadísticos son útiles para poder discriminar el perfil genético obtenido, de una población determinada. Para calcular la probabilidad de obtener un perfil genético se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- a. Calcular la frecuencia del genotipo para un locus;  $p$  y  $q$  son las frecuencias alélicas observadas en una base de datos para determinado alelo, estas frecuencias han sido determinadas en estudios poblacionales que van creando bases de datos para los marcadores que son utilizados por la mayoría de laboratorios forenses. La frecuencia del genotipo se calcula como se observa:

Frecuencia genotípica para homocigotos:  $P_i = p^2$

Frecuencia genotípica para heterocigotos:  $P_j = 2 pq$

- b. Para calcular la probabilidad de un determinado perfil, se multiplican todas las frecuencias para cada locus analizado (Collins y Morton; Li, 2008).

Mientras mayor sea el número de marcadores analizados, mayor será el poder de discriminación en una población determinada, y existirá menor probabilidad de que el perfil genético encontrado en la escena del crimen coincida con un individuo elegido al azar, por lo que la probabilidad de que provenga del sospechoso será altamente confiable. INACIF, como en muchos otros laboratorios forenses de Latinoamérica y España, utiliza la razón de verosimilitud o tasa de probabilidad comúnmente conocido como Likelihood Ratio (LR) para reportar la probabilidad de coincidencia entre dos perfiles genéticos. El LR se basa en el teorema de Bayes, que relaciona las probabilidades de acuerdo a dos hipótesis. En el caso de los análisis genéticos forenses, las hipótesis planteadas son: hipótesis uno ( $H_1$ ), que los perfiles encontrados en la escena del crimen y el perfil del sospechoso provengan de la

misma fuente; la segunda hipótesis ( $H_2$ ), que los perfiles genéticos provienen de diferente fuente, y el sospechoso casualmente tiene el mismo perfil que el obtenido de la escena del crimen. El LR es la probabilidad bajo la hipótesis  $H_1$  dividida por la probabilidad de la hipótesis  $H_2$  (Ayyub, y McCuen, 2003; Butler, 2005; Collins y Morton, 1994; Li, 2008).

$$LR = \frac{H_1}{H_2}$$

Para realizar los cálculos de LR se asume que la hipótesis  $H_1$  es igual a 1 (se asume que es el 100% de las probabilidades). Mientras que la hipótesis  $H_2$  puede ser calculada de la frecuencia fenotípica para un marcador en particular utilizando STR's. En el caso de STR's heterocigotos se utiliza la fórmula  $2pq$ , siendo  $p$  la frecuencia del alelo 1 y  $q$  la frecuencia del alelo 2 en una población determinada. En el caso de STR's homocigotos la fórmula utilizada será  $p^2$  (Butler, 2005; Li, 2008).

Por lo tanto la fórmula para calcular el LR para un marcador sería:

$$\text{STR homocigoto LR} = \frac{1}{p^2} \quad \text{STR heterocigoto LR} = \frac{1}{2pq}$$

Mientras más inusual sea el genotipo particular de un STR, más alto será el valor de LR, ya que existe una relación recíproca entre ambos. Por lo tanto, en una forma simple, el LR es el inverso de la frecuencia genotípica para cada locus y el producto de los LR específicos de cada locus utilizado, proporciona el LR total del perfil genético completo. Un LR superior a 1 apoya la hipótesis  $H_1$ , y al igual que en el caso de la probabilidad de coincidencia, entre mayor sea el número de marcadores utilizados, mayor será el valor de LR pudiendo alcanzar valores de trillones, cuatrillones o superiores (Aitken y Stoney, 1991; Collins y Morton, 1994; Li, 2008).

El LR se calcula solamente cuando los dos perfiles genéticos comparados coinciden en todos los alelos, si uno de los alelos de los marcadores analizados no coincide, se considera una exclusión (que los perfiles genéticos no provienen de la misma persona), y no se realiza el cálculo del LR. Es decir siempre que se calcula el valor de LR se presume que el perfil genético proviene del sospechoso, debido a que el valor de LR determina la tasa de probabilidad de que un perfil genético determinado, pueda ser encontrado en otra persona elegida al azar (Collins y Morton, 1994).

## **M. Interpretación de resultados genéticos**

Es importante señalar que la probabilidad de coincidencia y el LR, no indica la probabilidad de que alguien más sea culpable, o que alguien más pudiera dejar la evidencia biológica en la escena del crimen. De la misma forma, no indica la probabilidad de que el sospechoso sea culpable o que alguien más en realidad comparta el mismo genotipo. Por el contrario, la probabilidad de coincidencia y el LR solo estiman la frecuencia con la que se espera que aparezca un perfil genético en particular. La probabilidad de coincidencia también puede verse como la probabilidad teórica de que si se muestrea a una persona al azar, se obtendría un perfil genético coincidente con el de la escena del crimen (Butler, 2005).

La falacia condicional trasladada, presume que solo hay 1 probabilidad en un número determinado, 17,000 por ejemplo, de que el perfil genético provenga de otra persona, o que solo existe 1 en 17,000 probabilidades de que el defendido no sea culpable, son afirmaciones incorrectas utilizadas por la fiscalía para apoyar su caso. Una afirmación correcta sería que la probabilidad de obtener el perfil genético observado en la evidencia, a partir de un individuo elegido al azar es de 1 en 17,000, basado en los alelos presentes en la muestra científica forense. Al utilizar como mínimo los 13 marcadores recomendados por la comunidad internacional, el rango aumenta las probabilidades de 1 en trillones, cuatrillones o valores superiores. INACIF utiliza 16 o más marcadores para realizar los análisis genéticos, para los cuales se ha determinado su frecuencia alélica en una población mestiza guatemalteca, por lo que los resultados brindan valores de LR elevados que brindan un alto respaldo a los casos analizados (Aitken, y Stoney, 1991; Butler, 2005).

## **N. Datos obtenidos por estudios previos**

En Guatemala y Latinoamérica no existen estudios que hayan determinado la probabilidad de obtener perfiles genéticos a partir de indicios provenientes de agresiones sexuales. Sin embargo, si existen estudios enfocados en las pruebas de detección de semen y espermatozoides. Un ejemplo de este tipo de estudios, es el realizado en Bolivia por Quispe y colaboradores, en el cual se analizaron a 251 víctimas de violencia sexual. Los resultados mostraron un 37% de casos positivos para fosfatasa ácida, un 25% de observación de

espermatozoides, y un 35% de positividad para el estándar de oro, la detección de proteína seminal P-30. Esto significa que se detectó semen sin espermatozoides en un 10% de los casos estudiados, por lo que es de vital importancia, determinar la probabilidad de obtener ADN de este tipo de indicios (Quispe, Tarifa, Solíz, Sierra, 2010).

El objetivo principal de los análisis genéticos en casos de violación sexual (sexo masculino a sexo femenino), es obtener perfiles genéticos masculinos de las personas sospechosas de cometer el hecho. En esta línea de trabajo, Soares-Vieira y colaboradores realizaron un estudio basado en Y-STR's (marcadores basados en ADN del cromosoma Y), a partir de muestras de semen en individuos azoospermicos, demostrando que la ausencia de espermatozoides, no excluye la posibilidad de obtener ADN masculino a partir de un indicio. El estudio analizó 105 individuos previo y posteriormente a una vasectomía, demostrando grandes variaciones en la concentración de ADN entre ambos estados. La principal fuente de ADN en una muestra de semen son los espermatozoides, mientras que células no espermáticas encontradas en el semen, incluidas células germinales, leucocitos y células epiteliales normalmente se encuentran en una concentración inferior al 15% del fluido seminal. El estudio analizó a 90 de los 105 participantes (15 fueron excluidos por no cumplir con criterios de inclusión), y se obtuvo ADN del cromosoma Y de las muestras post-vasectomía en los 90 individuos que participaron en el estudio. Es importante considerar que las muestras de semen fueron obtenidas en condiciones óptimas, y las variaciones de ADN entre las muestras pre y post-vasectomía fueron significativas (en algunos casos hasta de 300µg de ADN), por lo que en indicios provenientes de casos de violación sexual donde existen otros interferentes, la cantidad de ADN puede no ser suficiente para obtener un perfil genético útil (Soares-Vieira, Correia, Sadayo, Iwamura, Andrade, Fíguro, Romero, Hallak, Bilharinho, Marmo, 2007).

#### IV. Justificación

Desde los inicios de la investigación forense, los científicos intentaron establecer qué tipo de análisis eran los más adecuados para detectar la presencia de semen y poder diferenciarlo de otro tipo de fluidos, por lo que se utilizaron pruebas bioquímicas, físicas, inmunológicas y tinciones especiales con dicho fin. Finalmente, luego de varios estudios y debates, en la actualidad existen metodologías ampliamente difundidas y estandarizadas, que son utilizadas por los laboratorios forenses para detectar semen y espermatozoides.

El INACIF utiliza la detección de fosfatasa ácida y proteína seminal P-30, como indicador de presencia de fluido seminal, además de utilizar la tinción de árbol de navidad para identificar espermatozoides. Una vez realizados dichos análisis surgen interrogantes respecto a las probabilidades que existen de obtener un perfil genético -útil para el cotejo con un sospechoso- a partir del indicio analizado, de acuerdo a los resultados obtenidos durante dichos análisis. Si bien la fuente más común y abundante de ADN a partir de indicios provenientes de casos de violación sexual son los espermatozoides, también puede obtenerse material genético de indicios donde se ha detectado solamente la presencia de semen, por las metodologías mencionadas. Determinar la asociación probabilística que existe entre la obtención de ADN a partir de cierto indicio de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de identificación de semen y espermatozoides, brindará información que, en conjunto con el análisis de la influencia de factores, tales como el tipo de indicio analizado y la procedencia de los mismos, entre otros, aportará datos que permitan respaldar los resultados plasmados por los peritos en los dictámenes y debates, además de estudiar la posibilidad de utilizar protocolos de extracción diferentes según las características del indicio que se trabaja. Finalmente permitirá informar a los agentes fiscales sobre probabilidades que existen de realizar cotejos genéticos en un caso en particular, a fin de que estas sean consideradas y les permita enfocar conscientemente su investigación.

## **V. Objetivos**

### **A. General:**

Determinar la asociación existente entre los resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual.

### **B. Específicos:**

1. Establecer la frecuencia de obtención de perfiles genéticos de sospechosos, en los casos de violación sexual incluidos en el estudio.
2. Relacionar los resultados genéticos, de acuerdo al tipo de indicio analizado y su procedencia.
3. Establecer la prueba de detección (fosfatasa ácida, P-30 y tinción de árbol de Navidad) que presenta mayor asociación con la obtención de un perfil genético.

## **VI. Hipótesis**

Existe asociación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual.

## VII. Materiales y Métodos

### A. Universo

1. Casos de violación sexual manejados por el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, en el período comprendido entre enero del 2010 hasta septiembre de 2011 (muestreo no probabilístico por conveniencia).
2. Criterios de inclusión:
  - a. Casos analizados por la Sección de Biología para la determinación de semen y espermatozoides -Fosfatasa Ácida, Proteína Seminal P-30 y Tinción de Árbol de Navidad-.
  - b. Casos en los que se cuenta con una muestra de referencia del sospechoso de cometer una violación, para cotejar con el ADN encontrado en los indicios provenientes de la violación.

### B. Materiales

#### 1. Equipo

- Refrigeradora
- Microcentrífuga para 24 tubos de polipropileno de 1.5mL.
- Baños de María secos.
- Real Time PCR 7,500 de Applied Biosystems®
- Termociclador GeneAmp 97000 System®
- Analizador Genético 3130 de Applied Biosystems®
- Computadoras

#### 2. Instrumentos

- Tijeras
- Agujas
- Pizetas
- Marcadores
- Lapiceros

#### 3. Reactivos

- Brentamina
- Colorante Rojo Rápido Nuclear
- Colorante Picro Índigo Carmín
- ABACard® p30 Test
- Agua destilada
- Agua ultrapura

- Etanol absoluto
- Chelex
- Tris-HCl [10mM]/EDTA [10mM]/NaCl [100mM]/ 2% SDS
- Laurilsarcosina
- Proteinasa K
- Solución amortiguadora para lavado espermatozoide (Tris-HCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0.5M, SDS al 2% y agua ultrapura)
- Ditiotreitól
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
- Solución amortiguadora TE<sup>-4</sup> 1x
- Kit Quantifiler™
- Kit Identifiler Plus®
- Size Standar LIZ®
- Formamida
- Papel Whatman FTA
- Papel encerado

### **C. Métodos**

#### **1. Preparación de hisopos con frotis de distintas regiones anatómicas (Gaensslen,1983)**

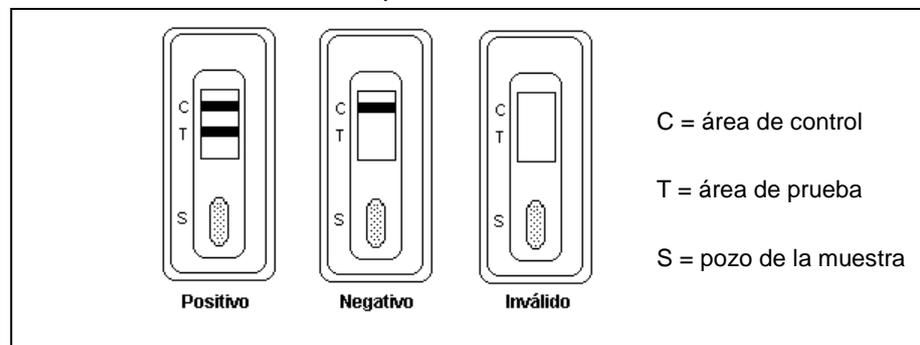
- a. Se realizaron cortes diagonales sobre los hisopos, cuidando dejar suficiente material para el análisis genético.
- b. Se agregó el fragmento cortado a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con tapa invertida.
- c. Se agregaron 500 µL de agua destilada.
- d. La muestra fue incubada a 4°C por un mínimo de 2 horas.
- e. Con un instrumento punzocortante, se abrieron cuatro agujeros en la tapa del tubo de centrifuga de tapadera invertida
- f. Con un aplicador de madera, se removió el pedazo de hisopo depositado en el tubo, colocándolo en la tapadera del mismo, cubierto con masking tape para evitar que se cayera.
- g. Se centrifugaron los tubos por 10 min a 4000 rpm.
- h. Luego de la centrifugación se obtuvo tres fracciones, las cuales se utilizaron de la siguiente forma:
  - i. Sobrenadante: utilizado para la detección de p-30.

- ii. Precipitado: se utilizó una gota (20µL aproximadamente) del precipitado para la búsqueda de espermatozoides a través de la tinción de árbol de navidad.
- iii. Tubo de centrifuga: el precipitado restante en el tubo de centrifuga, fue utilizado para la determinación de la enzima fosfatasa ácida.

## 2. Proteína seminal P-30 (Benton, Donahue y Valdez, 1998)

- a. Se sacó del empaque la placa y el gotero de *ABACard*®.
- b. Utilizando el gotero, se agregaron 8 gotas del sobrenadante (obtenido en el inciso 1) en el área de la prueba marcada como "S".
- c. Los resultados fueron leídos luego de 10 minutos, interpretando de la siguiente forma:
  - i. Formación de una banda rosa en el área de control, resultado Negativo (figura 3).
  - ii. Formación de dos bandas rosa, una en el área de control y otra en el área de la muestra, resultado positivo.

Figura 3  
Interpretación de resultados



Interpretación de resultados de análisis de p30, la formación de dos bandas indica un resultado positivo.  
Tomado de: Benton, Donahue, Valdez, 1998. Analysis of the *ABACard*® p30 Test for use in forensic laboratory.

## 3. Tinción de árbol de navidad (Gaensslen,1983)

- a. Tomando una gota del precipitado (20 µL aproximadamente) se realizó un frote en un portaobjetos.
- b. El frote fue fijado al calor y se aplicaron los colorantes de la siguiente forma:
  - i. Rojo Rápido Nuclear, hasta cubriendo el área del frote y se Dejo que se teñir por 10 minutos; (no se dejo secar el colorante).

- ii. Se Lavó la lámina con agua hasta quitar el exceso de colorante.
- iii. Se agregó Picro Índigo Carmín, hasta cubrir el área del frote y rotándolo a mano por 30 segundos.
- iv. Se lavó con etanol absoluto y se dejó secar.
- v. Los frotos fueron observados al microscopio con el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

#### **4. Determinación de fosfatasa ácida:**

- a. Se agregaron 2 gotas de Brentamina al tubo de centrifuga de tapadera invertida conteniendo el remanente de la preparación de la muestra.
- b. Se observó el tubo de centrifuga por un minuto, si presentaba presencia de una coloración rosada fuerte a púrpura, el resultado del análisis se reportó como positivo (Gaensslen,1983).

#### **5. Análisis de prendas de vestir, sábanas, sobre fundas y otros materiales:**

- a. Se cortó papel filtro Whatman No. 1 en piezas del tamaño de la prenda a analizar o del área donde se localizaron las posibles manchas de semen.
- b. Se colocó un fragmento de papel encerado del tamaño del papel filtro y se unieron, dejando el papel filtro al frente.
- c. Se humedeció el papel filtro con agua desmineralizada.
- d. El papel encerado junto al papel filtro se colocó sobre la prenda (dejando en contacto la prenda y el papel filtro) haciendo presión sobre toda la superficie de la misma durante un tiempo aproximado de un minuto.
- e. La solución de Brentamina fue aplicada sobre el papel filtro que estuvo en contacto con el indicio y observando la reacción, que se tomó como positiva si aparecía un color rosado fuerte/púrpura.
- f. La presencia de color rosado fuerte o púrpura debía aparecer como máximo después de un minuto, para considerar el resultado positivo.
- g. De la parte de la prenda que indicó presencia de fosfatasa ácida, se cortaron trozos para efectuar los procedimientos de confirmación de presencia de semen.

- h. El fragmento cortado fue colocado en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL,
- i. Se agregó 500µL de agua destilada.
- i. Se incubó a 4°C por un mínimo de 2 horas.
- j. Con un instrumento punzocortante, se abrieron cuatro agujeros en la tapa del tubo de centrifuga de tapadera invertida.
- k. Se removi6 el pedazo de hisopo depositado en el tubo, con un palicador de madera, colocándolo en la tapadera del mismo, cubierto con masking tape para evitar que se cayera.
- l. Se centrifugaron los tubos por 10 min. a 4000 rpm (Gaensslen, 1983).
- m. Luego de la centrifugaci6n, se utilizaron el sobrenadante y el precipitado para la determinaci6n de prote6na seminal p30 y tinci6n de 6rbor de navidad, procedimientos descritos en los incisos 2 y 3 (Gaensslen,1983; Prieto, 2007).

#### **6. M6todo de extracci6n muestras de referencia (Burke y Ferry, 1990)**

- a. Con el perforador de papel FTA de 1.2 mm o 2.0 mm se realizaron de una o dos perforaciones de la tarjeta FTA con mancha de sangre, y se trasladaron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL debidamente identificado.
- b. Se agregaron 1000 µL de agua ultra pura al tubo, colocándolo en v6rtex por 5 10 segundos e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente.
- c. Se coloc6 en v6rtex por 10 segundos y se centrifug6 por 3 minutos a 13,000 revoluciones por minuto (RPM).
- d. El sobrenadante fue descartado y se conserv6 el precipitado, aproximadamente 30 µL en el tubo.
- e. Se agregaron 200 µL de Chelex al 20% y se mezclaron en v6rtex por 10 segundos.
- f. Se incub6 por 30 minutos a 56°C.
- g. Se incub6 seguidamente a 95°C por 8 minutos.
- h. Se mezcl6 en v6rtex por 10 segundos y se centrifug6 por 3 minutos a 13,000 RPM.
- i. Se procedi6 a cuantificar el ADN.

## 7. Método de Extracción Diferencial (Burke y Ferry, 1990)

- a. Se cortó una porción de la muestra a analizar -hisopo, tela, etc.- (muestra analizada previamente para determinación de semen y espermatozoides).
- b. Se colocó la muestra en un tubo de 1.5 mL, debidamente identificado y se agregaron las siguientes soluciones:
  - i. 400  $\mu$ L Tris/EDTA/NaCl
  - ii. 25  $\mu$ L de Laurilsarcosina al 20%
  - iii. 75  $\mu$ L de Agua ultrapura
  - iv. 1  $\mu$ L de proteinasa K
- c. Se colocaron en vórtex por 10 segundos y se incubaron a 56°C por 24 horas.
- d. Se centrifugaron a 13,000 RPM por 5 minutos.
- e. El sobrenadante se removió y fue depositado en un tubo debidamente identificado como fracción femenina (FF), conservándolo a 4°C.
- f. Se lavó el precipitado celular con 500  $\mu$ L de la solución amortiguadora para lavado espermatozoide (Tris-HCl 1M pH 8, NaCl 5M, EDTA, SDS en agua ultrapura).
- g. Se mezcló brevemente en vórtex por 8 segundos y se centrifugó a 13,000 RPM.
- h. Se descartó el sobrenadante y se repitieron los pasos f, g y h hasta que se completaron tres lavados.
- i. Se agregaron 150  $\mu$ L Tris/EDTA/NaCl, 50  $\mu$ L de Laurisarcosina, 7  $\mu$ L DTT, 150  $\mu$ L de Agua ultrapura y 2  $\mu$ L de proteinasa K.
- j. Se mezcló con vórtex por 10 segundos y se incubó a 56°C por 2 horas.
- k. Nuevamente se mezcló con vórtex por 10 segundos y se centrifugó a 13,000 RPM por 3 minutos.
- l. Se añadieron 400  $\mu$ L del solvente fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la fracción femenina y a la fracción masculina. Colocándolas en vórtex por 10 segundos o hasta observarles una emulsión lechosa.
- m. Se centrifugó a 13,000 RPM por 3 minutos.
- n. Se ensambló el sistema de centrifugación que contiene: un concentrador y tubo estéril de 1.5 mL para microcentrifugación.

- o. Se agregaron 100  $\mu$ L de agua ultrapura al concentrador, para hidratar la membrana.
- p. La fase acuosa de la extracción fue transferida completamente al concentrador, cerrando la unidad.
- q. Se centrifugó a 500 x g de fuerza centrífuga relativa (RCF) por 10 minutos.
- r. Se retiró el concentrador y se descartó el filtrado. Se repitieron los pasos q y r hasta terminar de filtrar la fase acuosa del extracto, es decir concentra la mayor cantidad de ADN posible en la membrana a través de la centrifugación.
- s. Se agregaron 200  $\mu$ L de agua ultrapura al concentrador y se tapó.
- t. Se centrifugó a 500 x g RCF por 10 minutos.
- u. Se retiró el concentrador y se descartó el filtrado.
- v. Se agregaron 35  $\mu$ L de agua ultrapura al concentrador.
- w. El contenido del concentrador se invirtió en un tubo de 1.5 mL debidamente identificado.
- x. Se centrifugó el sistema (concentrador invertido y el tubo receptor) a 500 x g RCF por 5 minutos.
- y. Se descartó el concentrador y se procedió a la cuantificación de ADN.

**8. Cuantificación -PCR en tiempo real- (Burke y Ferry, 1990; Viuchard, Bottinelli, Cossu, Malik, Meier, Gehrig, Sulzer, Morerod, Castella, 2011)**

Utilizando el Kit Quantifiler™ Human DNA de Applied Biosystems se tomaron los siguientes pasos:

- a. Preparación de estándares para cuantificación:
  - i. Se identificaron 8 tubos de 0.2 mL con el número de patrón de la curva (estándar 1 al 8).
  - ii. Se agregó la cantidad de agua ultrapura necesaria y estándar como se indica en la tabla No.1

**Tabla No. 1**  
Estándares para Cuantificación

Estándar (St)	Concentración (ng/ $\mu$ L)	Volumen
1	50.000	10 $\mu$ L St (200 ng/ $\mu$ L)* + 30 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
2	16.700	10 $\mu$ L de St 1 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
3	5.560	10 $\mu$ L de St 2 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
4	1.850	10 $\mu$ L de St 3 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
5	0.620	10 $\mu$ L de St 4 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
6	0.210	10 $\mu$ L de St 5 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
7	0.068	10 $\mu$ L de St 6 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O
8	0.023	10 $\mu$ L de St 7 + 20 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O

\* Nota: El estándar es proporcionado en el kit.

b. Preparación de la mezcla de reacción:

- i. Se determinó la cantidad de muestras a analizar, tomando en cuenta los estándares previamente preparados (en duplicado) y el control negativo.
- ii. Se preparó una placa óptica de 96 pozos y un mapa donde se indicó la posición de cada muestra.
- iii. Se calculó la cantidad de reactivo a utilizar, multiplicando el número de muestras a analizar por el volumen de cada reactivo, como se observa en la tabla No. 2.

**Tabla No. 2**  
Cálculo de reactivos para cuantificación

Reactivo	Volumen $\mu$ L	No. de muestras	Volumen total
Primer Mix	10.5		
Reaction Mix	12.5		
Volumen total	23		

- iv. Se agregaron las cantidades calculadas en un tubo de 1.5  $\mu$ L y se mezcló con vórtex.
- v. Se agregaron 23  $\mu$ L de la mezcla preparada en cada uno de los pozos de la placa según la cantidad de muestras a analizar.

- vi. Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de la muestra según el mapa mostrado en la tabla No. 3.

**Tabla No. 3**  
Mapa para Cuantificación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	NTC	Mx								
B	Std2	Std2	Ctrl.-	Mx								
C	Std3	Std3	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx
D	Std4	Std4	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx
E	Std5	Std5	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx
F	Std6	Std6	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx
G	Std7	Std7	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx
H	Std8	Std8	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx	Mx

Std = Estándar, NTC = Control Negativo, Mx = muestra

- vii. Se selló la placa y se colocó en el REAL TIME PCR 7,500 de Applied Biosystem previamente encendido.
- viii. Se creó una plantilla ingresando el mapa previamente elaborado en la computadora conectada el equipo, y se eligió un ensayo de cuantificación absoluta en el programa SDS v1.2.3.

**9. Normalización (Burke y Ferry, 1990; Viuchard, Bottinelli, Cossu, Malik, Meier, Gehrig, Sulzer, Morerod, Castella, 2011)**

- a. Los resultados obtenidos durante la cuantificación de ADN, fueron analizados tomando en cuenta que el objetivo de la normalización es contar con una cantidad de ADN comprendida entre 0.5 a 1.25 ng en 10  $\mu\text{L}$  de mezcla.
- b. Tomando en cuenta la cantidad de ADN determinada en cada muestra, durante la cuantificación, se agregó la cantidad necesaria de muestra, como se observa en el ejemplo de la tabla No. 4.

**Tabla No. 4**  
Cálculo de normalización

Cantidad de ADN cuantificado ng	Volumen de muestra $\mu\text{L}$	Volumen de agua ultrapura $\mu\text{L}$	0.5 a 1.25 ng/10 $\mu\text{L}$
0.525	2	8	1.05 ng/10 $\mu\text{L}$

**10. Amplificación (Burke y Ferry, 1990; Viuchard, Bottinelli, Cossu, Malik, Meier, Gehrig, Sulzer, Morerod, Castella, 2011)**

Utilizando el kit Identifiler Plus® de Applied Biosystems se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- c. Se calculó la cantidad de reactivo a utilizar, multiplicando el número de muestras a analizar por el volumen de cada reactivo, como se observa en la tabla No 5.

**Tabla No. 5**  
Cálculo de reactivos para amplificación

Reactivo	Volumen $\mu\text{L}$	No. de muestras	Volumen total
Reaction Mix	10		
Primer Set	5		
Volumen total	15		

- d. Se agregaron las cantidades calculadas en un tubo de 1.5  $\mu\text{L}$  y se mezcló adecuadamente.
- e. Se agregaron 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla en cada uno de los pozos a utilizar.
- f. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra preparada (debe contener entre 0.5 a 1.25 ng de ADN).
- g. El termociclador GeneAmp 97000 System®, fue programado con 28 ciclos y 4 etapas de temperatura:
- i. 95°C por 11 minutos
  - ii. 94°C por 20 segundos
  - iii. 59°C por 8 minutos
  - iv. 60°C por 10 minutos -al finalizar los 28 ciclos programar el termociclador para conservar las muestras a 4°C.

**11. Tipificación -electroforesis capilar- (Burke y Ferry, 1990; Butler, 2005; Viuchard, Bottinelli, Cossu, Malik, Meier, Gehrig, Sulzer, Morerod, Castella, 2011)**

- a. Se preparó la solución para tipificación, calculando la cantidad de Size Standar LIZ y formamida de acuerdo a la cantidad de muestras a trabajar, como se observa en la tabla No. 6.

**Tabla No. 6**  
Cálculo de reactivos para amplificación

Reactivo	Volumen $\mu\text{L}$	No. de muestras	Volumen total
Standard LIZ	0.3		
Formamida	10		
Volumen total	10.3		

- b. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución preparada en cada uno de los pozos en donde se agregarán muestras.
- c. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra previamente amplificada.
- d. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la escalera alélica (Allelic Ladder) en las posiciones elegidas para dicho fin.
- e. Se colocó la placa a tipificar en el termociclador y se eligió la opción de desnaturalizar (95°C por 3 minutos).
- f. Se colocó la placa en una placa refrigeradora mantenida a -20°C, para provocar un shock térmico que mantenga la desnaturalización.
- g. Se ingresaron los datos de las muestras a analizar en la computadora conectada al analizador genético 3130.
- h. Los protocolos adecuados fueron elegidos de acuerdo al tipo de tipificación que se desea realizar.
- i. Se colocó la placa en el analizador genético.
- j. Se imprimieron los electroferogramas y fueron analizados.

## 12. Diseño del Estudio

Estudio retroprospectivo descriptivo, que evaluó cual de los análisis - fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 y tinción de árbol de Navidad-, tiene mayor asociación con la obtención de perfiles genéticos, esto se realizó en términos probabilísticos.

- a. Muestras: Casos de violación sexual manejados por el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala -INACIF-, en el período de enero del 2010 hasta septiembre de 2011, entre 125 y 175 casos aproximadamente (muestreo no probabilístico por conveniencia).
- b. Se creó una base de datos utilizando el programa Epi Info™ versión 3.5.3, diseñado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC). La base de datos cuenta con los resultados obtenidos por la Sección de Biología en las pruebas de fosfatasa

ácida, proteína seminal P-30 y tinción de árbol de navidad. También se ingresaron en dicha base, los resultados obtenidos por la sección de genética, en relación a la obtención positiva o negativa de perfiles genéticos para comparación con sospechosos.

- c. Se determinó la frecuencia de obtención de perfiles genéticos en todos los casos incluidos en el estudio. Además se determinó la frecuencia de obtención de perfiles genéticos según el tipo de indicio analizado (hisopos, calzón, sabana, pantalón etc.), y según procedencia o región anatómica (hisopado vaginal, anal, oral, etc.).
- d. Se diseñaron tres tablas de 2x2, colocando en las columnas la obtención de perfil genético (positivo o negativo), y en las filas -una prueba por tabla-, los resultados obtenidos en las pruebas de fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 y tinción de árbol de navidad.
- e. Se estableció la asociación existente entre la obtención de un perfil genético y los resultados obtenidos en las pruebas de detección de semen y espermatozoides, determinando el Odds Ratio (OR) –razón de posibilidades-, de cada una de las pruebas, en relación a la obtención de un perfil genético para comparación con un sospechoso.
- f. Se determinó el valor de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ), utilizando los datos a analizar como variables dicotómicas, con un grado de libertad, evaluando así la significancia estadística de las asociaciones establecidas.
- g. El intervalo de confianza utilizado para el análisis estadístico fue de 95% (IC 95%).

### VIII. Resultados

Un total de 137 casos de violación cumplieron los criterios de inclusión para ser parte del estudio, dichos casos fueron analizados en INACIF en el período de enero de 2010 a septiembre de 2011. Se realizaron las pruebas de fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 y tinción de Árbol de Navidad. Finalmente, se realizaron los análisis genéticos para asociar a los sospechosos con las víctimas y/o a escenas del crimen.

Se obtuvo un número mayor de resultados positivos en el análisis de P-30, con un total de 131 casos (95.62%), mientras que la tinción de AN fue el análisis que presentó un número menor de positivos con 119 de los 137 casos analizados. En cuanto a perfiles genéticos útiles para cotejo con un sospechoso, se obtuvo ADN en 103 casos, lo que representa una frecuencia de obtención de perfiles del 75.2% del total de los casos analizados (Tabla No.7).

Tabla No. 7  
Resultados totales obtenidos en los análisis realizados

Análisis	Resultado	
	Positivo	Negativo
<b>Fosfatasa ácida</b>	130	7
<b>Proteína Seminal P-30</b>	131	6
<b>Árbol de Navidad</b>	119	18
<b>Obtención de perfil genético</b>	103	34

Fuente: Datos experimentales.

En el análisis de fosfatasa ácida se obtuvo 130 resultados positivos de los 137 casos analizados. En 3 de los 7 casos con resultado negativo para fosfatasa ácida, se obtuvo un perfil genético de sospechoso de violación sexual. El Odds Ratio (OR) establecido entre esta prueba y la obtención de un perfil genético fue de 4.44 (IC 95% 0.94-20.97),  $\chi^2$  4.13 y un valor de "p" de 0.037 (Tabla No.8). El OR, también conocido como riesgo relativo estimado, es utilizado para determinar el grado de asociación existente entre dos variables estudiadas, un valor de OR >1 (IC95% >1->1), indica que existe una asociación significativa entre las variables estudiadas (Vicéns y Medina, 2005).

Tabla No. 8  
Asociación de resultados de la prueba de Fosfatasa ácida y obtención de un perfil genético

Resultado de Fosfatasa Ácida	Obtención de perfil genético		Total
	Si	No	
<b>Positivo</b>	100	30	130
<b>Negativo</b>	3	4	7
<b>Total</b>	103	34	137

Fuente: Datos experimentales. OR: 4.44 (IC 95% = 0.94-20.97),  $\chi^2$  = 4.13, p = 0.037

El análisis de proteína seminal P-30 fue la prueba que presentó un mayor valor de OR con relación a la obtención de un perfil genético, con un valor de 6.73,  $\chi^2$  de 5.89 y " $p$ " = 0.018, siendo este último también el valor más significativo, en relación a las asociaciones establecidas con los otros dos análisis utilizados en el estudio (FA y AN). En 2 de los 6 resultados negativos se obtuvo un perfil genético de un sospechoso, en los restantes 4 no fue posible obtener material genético útil para comparación (Tabla No. 9).

Tabla No. 9  
Asociación de resultados de la prueba de Proteína Seminal P-30 y obtención de un perfil genético

Resultado de Proteína Seminal P-30	Obtención de perfil genético		Total
	Si	No	
<b>Positivo</b>	101	30	131
<b>Negativo</b>	2	4	6
<b>Total</b>	103	34	137

Fuente: Datos experimentales. OR: 6.73 (IC 95%= 1.17-38.58);  $\chi^2 = 5.89$ ,  $p = 0.018$

La tinción de AN presento la mayor cantidad de resultados negativos con 18 casos, en 10 de los cuales fue posible la obtención de un perfil genético y solamente en 8 no se obtuvo material genético útil para comparación. El valor de OR observado es el más bajo de los tres establecidos, con 2.86, sin embargo, el valor de " $p$ " mostró una mayor asociación que el análisis de FA, con un valor de 0.027 (Tabla No. 10).

Tabla No. 10  
Asociación de resultados de la prueba de Árbol de Navidad y obtención de un perfil genético

Resultado de Árbol de Nvidad	Obtención de perfil genético		Total
	Si	No	
<b>Positivo</b>	93	26	119
<b>Negativo</b>	10	8	18
<b>Total</b>	103	34	137

Fuente: Datos experimentales. OR: 2.86 (IC 95% 1.03-7.98),  $\chi^2 = 4.27$ ,  $p = 0.027$

Se analizaron 16 tipos diferentes de indicios, que van desde hisopados vaginales y calzones hasta pañales de adultos y toallas sanitarias. La Tabla No. 7 muestra los tipos de indicios analizados durante el estudio, así como los resultados obtenidos durante el análisis de los mismos, para las pruebas de FA, P-30, tinción de AN y los resultados de los análisis genéticos.

Los cinco indicios más comunes analizados durante el estudio, fueron los hisopados vaginales (56), calzones (43), hisopados anales (8) y pantalones de lona (8). Finalmente el quinto indicio más común fueron los cortes típicos (prenda de vestir tradicional guatemalteca), con un total de 6 durante el período del

estudio. En 18 de los 56 hisopados vaginales analizados no fue posible la obtención de un perfil genético, lo que presenta el segundo porcentaje más alto (32.1%) de resultados genéticos negativos de los cinco indicios más comunes. Los hisopados anales mostraron el mayor porcentaje de análisis sin perfil genético, ya que en 3 de los 8 indicios no fue posible obtener material genético útil, lo que representa un 37.5%.

De los cinco indicios más comunes, el indicio que mostró los mejores resultados durante los análisis genéticos fueron los calzones, ya que solamente en el 11.6% de los casos no fue posible la obtención de un perfil genético (5 de 43), en el 88.37% (38) restante fue posible la obtención de un perfil genético de uno o más sospechosos. En el análisis de cortes típicos se obtuvo un perfil genético en 5 de los 6 casos (83.33%). Mientras que en los pantalones de lona se obtuvo un perfil genético en 6 de los 8 casos, lo que representa un 75% (Tabla No. 11).

Tabla No.11  
Resultados obtenidos según el tipo y procedencia de indicios

Tipo de Indicio	Fosfatasa ácida		Proteína seminal P-30		Árbol de Navidad		Perfil Genético	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo*	Negativo*
<b>Hisopado vaginal</b>	54	2	55	1	53	3	38	18
<b>Calzón</b>	41	2	41	2	34	9	38	5
<b>Hisopado anal</b>	7	1	7	1	8	0	5	3
<b>Pantalón de lona</b>	7	1	7	1	6	2	6	2
<b>Corte</b>	6	0	6	0	6	0	5	1
<b>Sábana</b>	3	0	3	0	3	0	2	1
<b>Calzoncillo</b>	2	0	2	0	2	0	0	2
<b>Short</b>	2	0	2	0	1	1	2	0
<b>Licra</b>	2	0	2	0	2	0	2	0
<b>Hisopado oral</b>	1	0	1	0	1	0	1	0
<b>Hisopado suprapúbico</b>	1	0	1	0	1	0	1	0
<b>Blusa típica</b>	1	0	1	0	1	0	0	1
<b>Pants</b>	0	1	0	1	0	1	1	0
<b>Falda</b>	1	0	1	0	0	1	0	1
<b>Pañal de adulto</b>	1	0	1	0	0	1	1	0
<b>Toalla Sanitaria</b>	1	0	1	0	1	0	1	0

Fuente: Datos experimentales. \*Los resultados de genética se colocan como positivo si se obtuvo un perfil genético y negativo de lo contrario.

## IX. Discusión de resultados

La asociación entre los análisis de FA, P-30 y tinción de AN, con la obtención de perfiles genéticos queda evidenciada al observar los valores de OR y el valor “*p*” establecidos en el presente estudio. Los valores de OR muestran que un resultado positivo en alguno de los tres análisis (FA: OR = 4.44; P-30: OR = 6.73 y tinción de AN = 2.86), aumenta la posibilidad de obtener un perfil genético. Los análisis de FA ( $p = 0.037$ ), P-30 ( $p = 0.018$ ) y la tinción de AN ( $p = 0.027$ ) mostraron valores inferiores a 0.05, que es el valor teórico de “*p*”, con intervalo de confianza del 95%, lo que indica que los tres análisis muestran asociaciones estadísticamente significativas con la obtención de un perfil genético de un sospechoso de violación sexual (Ruiz y Morillo, 2004; Vicéns y Medina, 2005).

El valor de OR establecido para el análisis de fosfatasa ácida fue de 4.44. Al observar este valor podría interpretarse que un análisis de fosfatasa ácida positivo aumenta la posibilidad de obtener un perfil genético. Sin embargo, al analizar intervalo de confianza al 95%, se observa que los valores pueden encontrarse entre 0.94-20.97, lo que indica que un resultado positivo de fosfatasa ácida, no necesariamente aumenta la posibilidad de obtener un perfil genético de un sospechoso de violación sexual. Esto se debe a que con un 95% de confianza el valor de OR puede estar entre 0.94 y 1, de lo cual, se podría interpretar que la viabilidad de obtener un perfil genético disminuye con un resultado de FA positivo (Aitken y Stoney, 1991; Vicéns y Medina, 2005).

El análisis de FA es útil para la detección presuntiva de semen, Pietro en el 2007, le atribuye una sensibilidad del 99,4%. Sin embargo, el mismo estudio demostró que 31 de cada 100 extractos que mostraron actividad de FA, fueron falsos positivos, lo que indica una alta sensibilidad y una baja especificidad, ya que esta enzima también se encuentra presente en otros fluidos humanos, microorganismos y algunos materiales de origen vegetal. Estos datos y los obtenidos en el presente estudio muestran que un análisis positivo de FA, no es evidencia suficiente de la presencia de semen, por lo que no sería factible realizar un análisis genético basado únicamente en el resultado obtenido en el análisis de FA (Gaensslen, 1983; Prieto, 2007; Ruiz y Morillo, 2004).

Un estudio realizado en 2009 por Montoya y colaboradores analizó la relación de las pruebas de FA, P-30, tinción de AN y la determinación de ADN del cromosoma Y. Dicho estudio determinó la sensibilidad de los tres análisis, utilizando muestras conteniendo semen y espermatozoides a distintas diluciones,

estableciendo que la sensibilidad del análisis P-30 (positivo en diluciones 1:100,000) era mayor que la sensibilidad de FA y tinción de AN, los cuales, siempre presentaban resultados negativos en diluciones de 1:50,000. En el presente estudio, se observó que la mayor cantidad de resultados positivos se obtuvo en el análisis de P-30 con un 95.62% de casos positivos, además de presentar la mayor asociación con la obtención de perfil genético de sospechosos de violación, con un valor de OR de 6.73 (IC 95%= 1.17-38.58) y un “p” de 0.018, mostrando ser el análisis más confiable para la predicción de presencia de semen y de ADN de un presunto agresor sexual (Montoya, Rodríguez, Pérez, García, 2010).

En el estudio realizado por Montoya y colaboradores, se buscó obtener el perfil genético del cromosoma Y de 27 muestras analizadas para semen y espermatozoides utilizando FA, P-30 y tinción de AN. En 13 de las 27 muestras se obtuvo resultado positivo para los tres análisis y también se obtuvieron perfiles genéticos del cromosoma Y. En dos de los casos se obtuvo un resultado positivo para P-30 y tinción de AN, mientras que el resultado de FA fue negativo, obteniendo en ambos casos ADN del cromosoma Y. En 3 casos se obtuvo resultado positivo para FA y negativo para los análisis de P-30 y tinción de AN. Solamente en uno de dichos casos se obtuvo un perfil genético parcial (con ausencia de alelos para algunos marcadores). Mientras tanto, en 4 casos se obtuvo un resultado positivo para P-30, y negativo para FA y tinción de AN, obteniendo un perfil genético del cromosoma Y. Solamente uno de los casos analizados, presentó resultado positivo únicamente para la tinción de AN y no fue posible obtener un perfil genético del mismo (Montoya, Rodríguez, Pérez, García, 2010).

Los datos mencionados respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, en relación al análisis de P-30, confirmando que es el análisis más confiable para la detección de semen y prediciendo una buena posibilidad de obtener ADN de sospechosos de violación sexual (OR = 6.73), en los indicios tomados o pertenecientes a la víctima. En adición, existe concordancia al establecer la baja posibilidad de obtener ADN de sospechosos de violación sexual, cuando se obtienen resultados negativos en los 3 análisis, ya que Montoya y colaboradores reportan que no se obtuvo ADN en los 4 casos con dichas características, mientras que en el presente estudio, 2 casos presentaron

resultados negativos para los 3 análisis, y en ninguno fue posible obtener material genético (Montoya, Rodríguez, Pérez, García, 2010).

La tinción de AN mostró el valor de OR más bajo de los tres análisis (2.86), sin embargo, a diferencia de la FA el IC 95% no cruza la barrera del 1 (1.03-7.98) lo que indica que la detección de espermatozoides con la tinción de AN, con un intervalo de confianza del 95%, aumenta la posibilidad de obtener ADN, desde 1 hasta casi 8 veces. Estos datos muestran que la tinción de AN es un buen indicador en cuanto a la posterior obtención de un perfil genético de sospechosos de agresión sexual (Behre y Nieschlag, 2000; Prieto, 2007; Vicéns y Medina, 2005).

Adicionalmente, los espermatozoides son considerados la mayor fuente de ADN en los análisis de muestras de semen, tomando en cuenta que en un individuo normospermo, se espera extraer unos 450 µg de ADN del eyaculado, mientras en un individuo azoospermico es factible detectar unos 30 µg, lo que representa aproximadamente el 6.3% de una muestra que cuenta con espermatozoides. Sin embargo, los datos obtenidos muestran que se obtuvo un perfil genético de sospechoso de violación sexual, en 10 de los 18 casos negativos para la tinción de AN, es decir se obtuvo ADN en el 55% de los casos negativos. Al comprar este dato con el 33% de obtención de ADN en los casos negativos para P-30 (2 de 6), queda en evidencia que un resultado negativo de P-30, disminuye en mayor medida la posibilidad de obtener ADN de un presunto violador (Behre y Nieschlag, 2000; Prieto, 2007).

El hecho de que no se hayan observado espermatozoides con la tinción de AN y se haya obtenido ADN de las muestras que mostraron presencia de semen (P-30 y/o FA positivos) puede atribuirse a varios factores. Por ejemplo, una vez establecida la presencia de semen en un indicio, es factible asumir que pudo existir transferencia de otras fuentes de ADN del agresor, tales como células epiteliales, leucocitos, células uretrales y prostáticas. En adición, es importante tomar en cuenta, como ha sido mencionado previamente, la tinción de AN es considerablemente menos sensible que el análisis de P-30, por lo que un resultado negativo en la tinción de AN, no descarta totalmente la posibilidad de que exista una cantidad baja de espermatozoides (Behre y Nieschlag, 2000; Prieto, 2007).

Se obtuvo perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual en el 75.2% de los casos incluidos en el estudio (103 de 137), en 2 de los cuales los

resultados para los análisis de FA, P-30 y tinción de AN fueron negativos. Esto significa que en 32 casos que presentaron como mínimo un resultado positivo, para uno de los tres análisis, no fue posible obtener ADN de un sospechoso de violación sexual. Esto puede atribuirse principalmente a la degradación del ADN de la muestra debida a la presencia de microorganismos (bacterias y hongos), así como a la presencia de inhibidores de la PCR, los más comunes encontrados en los casos de violación sexual, por la naturaleza de las muestras forenses son: la hematina presente en la sangre, la melanina del pelo, las sales biliares presentes en las heces, las sustancias húmicas de la tierra, la urea de la orina y los tintes utilizados en textiles. Finalmente, es importante mencionar que dichos análisis determinan la actividad de fosfatasa ácida, presencia de P-30 y de espermatozoides, en ningún momento determinan la cantidad o calidad de ADN presente, por lo que como se observó en 8 de los casos del estudio, un resultado positivo para los tres análisis, no garantiza la posterior obtención de un perfil genético de sospechosos de violación sexual (Gill, Jeffreys, Werrett, 1985; Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, y Losick, 2004).

Los hisopados tomados a la víctima, son los indicios más comunes obtenidos de los casos de violación sexual. En el presente estudio este tipo de indicios representó el 47.45% del total de indicios analizados (56 hisopados vaginales, 7 hisopados anales, 1 hisopado suprapúbico y 1 hisopado oral). En los hisopados vaginales y anales se obtuvo excelentes resultados en los análisis de FA, P-30 y tinción de AN. Por ejemplo, en los hisopados vaginales solamente se obtuvo 2 resultados negativos para FA, 1 para P-30 y 3 para la tinción de AN de un total de 56 indicios. Sin embargo, solamente en 38 hisopados vaginales, fue posible la obtención de un perfil genético de un sospechosos de violación sexual, que representa una frecuencia del 67.86%. En el caso de los hisopados anales se obtuvo 1 resultado negativo para los análisis de FA y P-30, y los 8 indicios fueron positivos para la presencia de espermatozoides con la tinción de AN. A pesar de resultados tan promisorios, solamente en 5 de los 8 casos fue posible obtener ADN de un presunto violador, mostrando una frecuencia de 62.5%. Además de la presencia de inhibidores y degradación del ADN propios de los análisis forenses, cabe resaltar que si bien los hisopados son tomados directamente de la víctima, es importante el tiempo que transcurre entre la violación y el reconocimiento médico forense, esto puede definir la cantidad de ADN que puede recuperarse de los hisopados, ya que la microbiota vaginal y anal puede fácilmente degradar el

ADN de las células transferidas por el sospechoso. También es importante considerar que una de las primeras reacciones de una víctima de violación, es bañarse e intentar deshacerse de cualquier rastro que pueda haber dejado en su cuerpo el episodio violento, lo cual disminuye considerablemente la cantidad de ADN que podría recuperarse a través de hisopados (Behre y Nieschlag, 2000; Prieto, 2007).

Las prendas de vestir, principalmente las prendas íntimas femeninas, fueron el tipo de indicio que mostró mejores resultados en cuanto a la frecuencia de obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual. Se obtuvo ADN de sospechosos en 38 de los 43 calzones analizados durante el estudio, lo que representa una frecuencia del 88.34%. Este dato confirma lo expuesto por Paredes en 1988, en cuanto a que prácticamente es obligatorio recuperar la ropa interior que la víctima vestía durante los hechos. Los calzones se convierten en un excelente indicio para los análisis forenses, ya que en el momento en que la víctima se coloca de nuevo la ropa interior, los movimientos peristálticos de la vagina, en conjunto con la gravedad, provocan que los fluidos dejados por el sospechoso descendan hacia el calzón, por lo que esta prenda absorberá gran parte del material genético presente en la escena. También existe la posibilidad de que la violación suceda cuando la víctima tenga puesta la ropa interior, por lo que ésta, estaría en contacto directo con el agresor y con los fluidos dejados por el mismo (Gill, Jeffreys, Werrett, 1985; Paredes, 1988).

Otras prendas de vestir como los pantalones de lona y los cortes típicos, presentaron una alta frecuencia en la obtención de perfiles genéticos, con 75% (6 de 8) y 83.33% (5 de 6) respectivamente. Además, en dos shorts y dos licras analizadas durante el estudio, fue posible la obtención de perfiles genéticos. Estos datos demuestran el gran aporte de las prendas de vestir en los análisis genéticos donde se pretende obtener ADN de sospechosos de violación sexual, siendo importante señalar, que en este tipo de indicios, es de suma importancia la detección exacta del lugar donde se encuentra el fluido seminal y la historia del caso que se está analizando (Paredes, 1988; Prieto, 2007).

## X. CONCLUSIONES

1. Existe una asociación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en los análisis de fosfatasa ácida, proteína seminal P-30 y tinción de árbol de navidad, con la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual.
2. La frecuencia de obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual fue de 75.2% de los casos analizados, mostrando excelentes resultados para las metodologías utilizadas para análisis genéticos por INACIF.
3. Las prendas de vestir íntimas femeninas mostraron los mejores resultados en la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual, con una frecuencia de 88.37%.
4. El análisis de proteína seminal P-30 mostró la mayor asociación con la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual, con un valor de OR de 6.73 (IC 95% = 1.17-38.58),  $\chi^2$  5.89 y valor "p" = 0.018.
5. La asociación establecida entre el análisis de fosfatasa ácida y la obtención de un perfil genético de un sospechoso de violación sexual (OR = 4.44,  $\chi^2$  = 4.13, IC 95% = 0.94-20.97), indica que un resultado positivo de fosfatasa ácida, no necesariamente aumenta la posibilidad de obtener un perfil genético de un sospechoso de violación sexual.

## **XI. Recomendaciones:**

1. Difundir el presente estudio las autoridades competentes que solicitan los análisis genético comparativos (fiscales y jueces), así como a médicos forenses y demás personas que forman parte del sistema de justicia guatemalteco, con el fin brindar una herramienta útil, respecto a las bases científicas de los análisis genético forenses en casos de violación sexual.
2. Tomar como mínimo tres hisopos por región anatómica a estudiar, para aumentar las posibilidades de obtener ADN de los mismos.
3. Hacer énfasis en la importancia de recuperar la ropa interior que viste la víctima al momento de la violación, ya que puede llegar a convertirse en el indicio que aporte la información necesaria para esclarecer el hecho delictivo.

## XII. Referencias

- Aitken, C. y Stoney, D. (1991). *The use of statistics in forensic science*. New York: Ellis Horwood.
- Asociación Española de Evidencias Electrónicas (2009). *El principio de intercambio de Locard*. Recuperado de <http://aedel.es/2009/02/12/el-principio-de-intercambio-de-locard/>
- Ayyub, B. y McCuen, R. (2003). *Probability, Statistics, and Reliability for Engineers and Scientists*, 2nd Edition. Washington, DC: Chapman & Hall/CRC.
- Benton, K.A., Donahue, J.A. y Valdez, Jr. M. (1998). *Analysis of the ABACard® p30 Test for use in forensic laboratory*.
- Behre, H., y Nieschlag, E., (2000). *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer 155.
- Breul J., Pickl U. y Hartung R. (1994). *Prostate-specific antigen in urine*. *Eur Urol* 26(1):18.
- Burke y Terry (1990). *DNA fingerprinting: approaches and applications*. Boston: Birkhauser Verlag, 191. (Papers from the First International Symposium on DNA Fingerprinting, Bern, Switzerland).
- Burley, L., (s.f.) *Identifiler® Plus: Verification and confirmation test site results*. Santa Clara County Crime Laboratory. San Jose, CA.
- Bustin, (2005). Real-Time PCR. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker. New York.
- Butler, J., (2005). *Forensic DNA Typing. Biology, Technology, And Genetics of STR markers*. Second Edition. Elsevier.
- California Commission on Peace Officer Standards and Training (1999), *Guidelines for sexual assault investigation*. Post Media Distribution Center 1601 Alhambra Boulevard, Sacramento California.
- Clayton et al. (1998) *Steps in the interpretation of mixture*. *Forensic Science International* 91:55-7.

- Clements J. y Mukhtar A. (1994). *Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab 78: 1536.
- Collins, A. y Morton E. (1994). *Likelihood ratios for DNA identification*. CRC Genetic Epidemiology Research Group, Department of Child Health, University of Southampton, Level G, Princess Anne Hospital, Southampton, S09 4HA, United Kingdom.
- Davies, A. y Wilson, E., (s.f.) *The presistance of seminal constituents in the human vagina*. Metropolitan police forensic science laboratory, Elsevier Sequoia. London.
- Diario de Centro América; Jueves 19 de febrero 2009 No. 37,388 año CXXIX, Pag. 3
- Estados Unidos (1983). Federal Bureau of Investigation. *Proceedings of a forensic science symposium on the analysis of sexual assault evidence*.
- Forensics DNA Diagnostic Center, (2008). *Short Tandem Repeats (STRs)*. Recuperado en: <http://www.forensicdnacenter.com/dna-str.html>.
- Fuertes, J. et. al. (2007). *Esquemas en ciencias forenses y derecho sanitario*. Editoriales Madrid 246.
- Gaensslen R. (1983). *Sourcebook in forensic serology, and biochemistry*. U. S. Department of Justice National Institute of Justice, Copyright, by the Research Foundation of the City University of New York, pp.
- Gill, P., Jeffreys, A. y Werrett, D. (1985). *Forensic application of DNA fingerprints*. Nature 318(6046), 577-582.
- Guatemala (1973). *Código Penal*. Congreso de la república de Guatemala.
- Guatemala (2009). *Congreso de la república. Ley contra la violencia sexual, Explotación y Trata de Personas -Decreto Número 9-2009-*.
- Guatemala (2009). Instituto Nacional de Ciencias Forenses. *Memoria de Labores de enero a diciembre del año 2009*.
- Greenspoon, S., Scarpetta, M., Drayton, M. y Turek, S. (1998). *QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework*. J Forensic Sci 43(5): 1024-1030.

- Hazen, C. (1955). *Measurement of acid phosphatase activity to identify seminal stains*. The Journal of Criminal Law, Criminology, and Police Science, Vol. 46, No. 3 pp. 408-413.
- Hochmeister, M., Rudin, O., Borer1, U.V., Kratzer, A., Gehrig, Ch. y Dirrhofer, R. (1999): *Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid*. J. Forensic Sci. 44: 1057-1060.
- Inman, K. y Rudin, N., (1997) *An introduction to forensic DNA analysis*, CRC Press. Jiménez, A. (2004). *Criminalística*. Recuperado de <http://www.mailxmail.com/curso-criminalistica/indicio-evidencia>,
- Kristaly, A. y Smith, D.A.S. (1999). *Validation of ABACard® p30 test for the rapid forensic identification of semen*.
- Laux, D.L., Tambasco, A.J. y Bezinger E.A (s.f.). *Forensic detection of semen II. Comparison of the Abacus Diagnostics OneStep ABACard p30 Test and the Seratec PSA Semiquant Kit for the Determination of the Presence of Semen in Forensic Cases*.
- Lee, H., Gaensslen R., Bigbee, P. y Kearney, J., (1991). *Guidelines for the collection and preservation of DNA evidence*. Journal of Forensic Identification. 41: 344-356.
- Li, R. (2008). *Forensic biology*. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton, London.
- Lorente, J.A., Lorente, M., Lorente, M.J., Alvarez, J.C., Entrala, C., Lopez-Munoz, J. y Villanueva, E. (1998) *Progress in Forensic Genetics*, Forensic Science International. 7: 114–116.
- Marrakchi, S. y Maibach, H., (2006). *Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences*. Skin Pharmacol Physiol. 19(3):177-80. Epub 2006.
- McLaren, R. (2007). *PowerPlex®16 versus Identifiler® Systems sensitivity and effects of inhibitors*. Promega Corporation.
- Martínez, E., Martínez, L., Fernández, F., Entrala, C., Alvarez, J., Lorente, J.,... Ovalle, M. *Guatemala Mestizo Population Data on 15 STR Loci (Identifilers Kit®)*. J Forensic Sci, September 2006, Vol. 51, No. 5

- Martini y Frederic, H. (2005). *Anatomy & Physiology*. Prentice Hall. Jurong, Singapore.
- Mbogori, M., Kimani, M., Kuria, A., Lagat, M. y Danson, J. (2006). *Optimization of FTA technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection*. African Journal of Biotechnolog.
- Mayntz-Press, K., y Ballantyne, J., (2007). *Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems*. J Forensic Sci, Vol. 52(5).
- McLaren, R. (2007). *PowerPlex®16 versus Identifiler® Systems sensitivity and effects of inhibitors*. Promega Corporation.
- Milena, A. (2009). *Cadena de custodia*. Recuperado de <http://bonesforum.blogspot.com/2009/07/cadena-de-custodia.html>
- Montoya, L., Rodríguez, H., Pérez, M., García, R. (2010). *Relationship of spermatoscopy, prostatic acid phosphatase activity and prostate-specific antigen (p30) assays with further DNA typing in forensic samples from rapes cases*. Forensic Science International 206 (2011) 111–118.
- Paredes, M. (1988). *La Prueba del ADN en la Investigación Criminal*. Departamento de Docencia y Formación Especializada de Genética Forense. España.
- Prieto, V. (2007). *El estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de biología*. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses Departamento de Sevilla.
- Quispe, S., Tarifa, S., Solíz, P. y Sierra, A. (2010). *Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense*. Instituto de Investigaciones Forenses, Ministerio Público, La Paz, Bolivia.
- Ruiz y Morillo (2004). *Epidemiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. pp. 576.
- Soares-Vieira, J., Correia, A., Sadayo, E., Iwamura, M., Andrade, R., Fígaro, G., ...Marmo, A. (2007). *Y-STRs in forensic medicine: DNA analysis in semen samples of azoospermic individuals*. J Forensic Sci 52(3).
- Tirado, C. y Diaz, O., (2007). *DNA extraction and concentration organic method*. Criminalistics Central Laboratory, Forensic DNA Serology

Laboratory. Instituto de Ciencias Forenses. San Juan Puerto Rico. ICF-1122-LAB.

- Vicéns, J. y Medina, M. (2005). Análisis de datos cualitativos. Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de: [http://www.uam.es/personal\\_pdi/economicas/eva/pdf/tab\\_conting.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/economicas/eva/pdf/tab_conting.pdf)
- Viuchard, S., Bottinelli, M., Cossu, C., Malik, N., Meier, V., Gehrig, C.,... Castella, V., (2011). *Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a swiss collaborative study*. Investigative Genetics. 2:11.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2004). *Molecular biology of the gene*. Fifth edition. San Francisco.
- Wheeler, B. y Wilson L., (2008). *Practical forensic microscopy: A Laboratory Manual*. Wiley Editorial. New York.
- Yu H, et. al. (1994). *Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and it's association with steroid hormone receptors and patient age*. Clin Biochem 75.