

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA.
SECCIÓN DE LABORATORIO CLÍNICO.**



**INFORME FINAL DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN:
EN GENÉTICA FORENSE EN EL LABORATORIO CLÍNICO**

TÍTULO DEL INFORME FINAL

**UTILIZACIÓN DE UMBRALES DE EXTRACCIÓN DIFERENCIAL PARA DEDUCIR
LA EXISTENCIA DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS DE CASOS
FORENSES**

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE:
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**

PRESENTADO POR:

**CAMPOS CHICAS, AURORA AYDEE N° CARNÉ CC11064
DIAZ ORELLANA, ANA EUDELIA N° CARNÉ DO19003
PINEDA GRANADOS, GLENDA SARAHÍ N° CARNÉ PG19011**

DOCENTE ASESOR:

LICDA. XIOMARA PASTORE DE RODAS

**OCTUBRE DE 2024
SAN MIGUEL, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES



MSC. JUAN ROSA QUINTANILLA
RECTOR

DRA. EVELYN BEATRIZ FARFÁN
VICERRECTORA ACADÉMICA

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

LIC. PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA
SECRETARIO GENERAL

LIC. CARLOS ALMILCAR SERRANO RIVERA
FISCAL GENERAL

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
AUTORIDADES



MSC. CARLOS IVÁN HERNÁNDEZ FRANCO

DECANO

DRA. NORMA AZUCENA FLORES RETANA

VICEDECANA

LIC. CARLOS DE JESÚS SÁNCHEZ

SECRETARIO

DR. AMADEO ARTURO CABRERA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA.

MSC. MARTA LILIAN RIVERA

**COORDINADORA DEL PROCESO DE GRADO DE LA CARRERA DE
LABORATORIO CLINICO**

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN:	1
JUSTIFICACIÓN:	4
DESARROLLO Y CONTENIDO:	6
Marco conceptual	14
RESULTADOS	21
CONCLUSIONES	25
ANEXOS	27
BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se basa en el estudio específico de las muestras recolectadas para estudio forense, en casos de delitos sexuales, se obtienen del cuerpo de la víctima, lo que significa que pueden contener predominantemente células epiteliales de ella. Esto significa que, si se lleva a cabo un análisis directo sobre la muestra, sin haber realizado una preparación previa de la misma, se podrían obtener resultados no satisfactorios.

Una de las técnicas más empleadas para el aislamiento de espermatozoides en estos casos es la extracción diferencial (DE). Este método se basa en el aislamiento de información genética del agresor a partir de las características químicas de los espermatozoides y las células epiteliales. Esto es posible ya que las células epiteliales son significativamente más grandes y más frágiles que los espermatozoides y se lisan fácilmente con la adición de detergentes y agitación suave, no así en el caso de los espermatozoides, pues la cabeza que es la que contiene ADN está rodeada por el acrosoma y la membrana del esperma, que funcionan como capas protectoras de enlaces disulfuro, proporcionando así una resistencia considerable a la lisis celular. De modo que el objetivo de la extracción diferencial es lisar selectivamente y recolectar el ADN nuclear de las células epiteliales frágiles antes de la lisis y la extracción del ADN de los espermatozoides para evitar de esta forma interferencias en el análisis de ADN.

En esta oportunidad se evaluó un conjunto de tipos de muestras biológicas de donantes masculinos, incluidas células bucales, epiteliales, saliva y semen, para evaluar el fraccionamiento del ADN masculino utilizando protocolos de extracción y cuantificación diferencial.

Palabras clave: Extracción diferencial; espermatozoides; células epiteliales; genética.

ABSTRACT

This research work is based on the specific study of samples collected for forensic study in cases of sexual crimes, which are obtained from the victim's body, which means that they may contain predominantly epithelial cells from the victim. This means that, if a direct analysis is carried out on the sample, without having previously prepared it, unsatisfactory results could be obtained.

One of the most commonly used techniques for the isolation of sperm in these cases is differential extraction (DE). This method is based on the isolation of genetic information of the aggressor from the chemical characteristics of the sperm and epithelial cells. This is possible because epithelial cells are significantly larger and more fragile than sperm and are easily lysed with the addition of detergents and gentle agitation. This is not the case for sperm, since the head, which contains DNA, is surrounded by the acrosome and sperm membrane, which function as protective layers of disulfide bonds, thus providing considerable resistance to cell lysis. Thus, the objective of differential extraction is to selectively lyse and collect nuclear DNA from fragile epithelial cells prior to lysis and extraction of sperm DNA in order to avoid interference in DNA analysis.

On this occasion, a set of biological sample types from male donors, including buccal, epithelial, saliva and semen cells, were evaluated to assess the fractionation of male DNA using differential extraction and quantification protocols.

Keywords: Differential extraction; spermatozoa; epithelial cells; genetics.

INTRODUCCIÓN:

En las décadas transcurridas desde la introducción del análisis forense de ADN, la tecnología para la tipificación de ADN ha avanzado rápidamente. La sensibilidad proporcionada por las capacidades actuales de tipificación de repetición corta en tándem (STR) ha llevado a un cambio en la capacidad de analizar la evidencia de ADN obtenida de las escenas del crimen. En lugar de simplemente identificar al individuo del que se originó la muestra, también es importante comprender la fuente celular del ADN. En conjunto, estos datos pueden proporcionar la información necesaria para evaluar las proposiciones sobre cómo llegó el ADN a estar presente en el elemento de prueba. Evaluar la fuente celular del ADN obtenido de elementos de prueba en supuestos casos de agresión sexual puede proporcionar información importante para los investigadores, en particular cuando la víctima y el acusado son conocidos.

Después de una agresión sexual, es muy importante que la víctima recurra a las autoridades, con la finalidad de hacer un examen médico forense lo antes posible. Esto con la finalidad de recopilar evidencia biológica que podría proporcionar información genética para la identificación del agresor.

Las pruebas de agresión sexual suelen incluir muestras internas y externas obtenidas del cuerpo de la víctima después de la supuesta agresión sexual. Estas muestras suelen ser mezclas de ADN de la víctima combinado con saliva, semen y/o células epiteliales del agresor. Si se sospecha que la muestra contiene líquido seminal, las pruebas suelen someterse a extracción diferencial y pruebas serológicas. Las pruebas serológicas suelen incluir la visualización de células espermáticas mediante microscopía, así como pruebas de componentes del líquido seminal, como la fosfatasa ácida (FA) y el antígeno prostático específico (PSA o P30).

En los laboratorios forenses las pruebas de AP (Antígeno Prostático) y P30 (Proteína 30) positivas en combinación son confirmatorias para el semen ; sin

embargo, las proteínas detectadas con estas pruebas no están tan protegidas como el ADN dentro de la cabeza de la célula espermática, lo que significa que pueden degradarse mientras que las células espermáticas pueden persistir. Las pruebas de Antígeno Prostático (AP) y Proteína30 (P30) rara vez son positivas para las muestras recolectadas 48 horas o más después de la agresión. La visualización de las células espermáticas mediante microscopía también es confirmatoria, pero no tiene la misma sensibilidad que el perfil STR (short tandem repeat) debido a que se utilizan porciones más pequeñas de una muestra para la microscopía en comparación con la muestra tomada para la prueba de ADN. Por lo tanto, no es raro obtener resultados de perfil de ADN interpretables de muestras de agresión sexual que pueden ser serológicamente negativos o no concluyentes, en particular cuando hay un retraso significativo entre la agresión y la recolección de evidencia, como se observa con el trabajo de casos del Laboratorio de Investigación Criminal del Ejército de los Estados Unidos, División de ADN, Forest Park.

El procedimiento de extracción diferencial fue diseñado para separar los espermatozoides de las células epiteliales a través de una lisis preferencial de la muestra. Este proceso da como resultado la fracción uno (F1) que consiste principalmente en ADN de células no espermáticas fáciles de lisar, mientras que la segunda fracción (F2) consiste principalmente en ADN de células espermáticas difíciles de lisar, aunque se observa transferencia de ADN entre fracciones. La combinación de pruebas serológicas y extracción diferencial puede proporcionar información sobre la fuente celular y la identidad del contribuyente de la muestra de ADN, respectivamente.

Alderson et al. demostraron que las extracciones diferenciales pueden dar como resultado el fraccionamiento de bajas cantidades de ADN de muestras de saliva en F2, lo que complica la creencia común de que los espermatozoides son el tipo de célula principal que se fracciona en F2. Aunque existen pruebas confirmatorias para la presencia de semen, actualmente no hay pruebas confirmatorias ampliamente disponibles para la detección de saliva dentro de muestras biológicas e incluso cuando se detecta actividad de amilasa, se encontró que no tenía correlación con

la cantidad de ADN en la muestra. Como resultado, los casos de bajas cantidades de ADN masculino en F2 de una extracción diferencial pueden hacer que sea extremadamente difícil, si no imposible, identificar de manera concluyente la fuente celular de ADN incluso en el caso de que se obtenga un perfil de ADN. La información de esta naturaleza en los casos forenses es crucial, ya que simplemente conocer la fuente biológica del ADN puede influir significativamente en el resultado de un caso.

Los investigadores descubrieron que la porción mínima de ADN masculino detectada en F2 de una muestra que contenía esperma fue del 52,6% y la porción máxima de ADN masculino detectada en F2 de una muestra sin esperma fue del 7,7%. A partir de estos resultados, se implementó un umbral mínimo del 50% de ADN masculino correspondiente a al menos 240 pg de ADN masculino dentro de F2 para inferir la presencia de esperma dentro de una muestra.

En el trabajo revisado en esta oportunidad se evaluó un conjunto de tipos de muestras biológicas de donantes masculinos, incluidas células bucales, epiteliales, saliva y semen, para evaluar el fraccionamiento del ADN masculino utilizando protocolos de extracción y cuantificación diferencial. Debido a que también se informó un aumento en el fraccionamiento del ADN masculino en presencia de secreciones vaginales, se evaluó el fraccionamiento del ADN masculino en F2 de varias diluciones de saliva, semen y mezclas de saliva/semen en presencia o ausencia de secreciones vaginales. También se analizó el fraccionamiento del ADN masculino de muestras de semen vasectomizado, mezclas de saliva y semen de dos hombres diferentes, muestras poscoitales de intervalos poscoitales variables, así como muestras de saliva y semen lavadas. Finalmente, se evaluaron los datos de un gran conjunto de muestras de casos para finalizar los umbrales para la implementación dentro del Laboratorio de Investigación Criminal del Ejército de los EE. UU. (USACIL)

JUSTIFICACIÓN:

La utilización de umbrales diferenciales de extracción para deducir la existencia de espermatozoides en muestras de casos forenses es un tema de gran relevancia y justificación por varias razones fundamentales:

Precisión y Sensibilidad: Los umbrales diferenciales de extracción se refieren a técnicas analíticas que permiten detectar la presencia de material genético en muestras biológicas con alta sensibilidad y precisión. Esto es crucial en el ámbito forense, donde la detección confiable de espermatozoides puede ser determinante para resolver casos.

Identificación de Donantes: La presencia de espermatozoides en muestras biológicas puede ayudar a identificar a un individuo implicado en un delito sexual o en otros tipos de casos donde se involucren muestras biológicas. Los umbrales diferenciales de extracción permiten diferenciar entre muestras que contienen espermatozoides y aquellas que no, lo cual es crucial para la investigación criminal.

Métodos Avanzados de Análisis: Estas técnicas representan lo último en tecnología forense, utilizando métodos como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y otras técnicas de biología molecular que pueden amplificar y detectar incluso pequeñas cantidades de ADN espermático. Esto facilita la extracción de perfiles genéticos que pueden ser utilizados como evidencia en tribunales.

Aplicación en Casos Antiguos o Contaminados: Los umbrales diferenciales de extracción también son útiles en casos donde las muestras pueden estar degradadas, contaminadas o haber sido almacenadas por períodos prolongados. Estas técnicas pueden ayudar a recuperar información genética útil incluso en condiciones adversas.

Estandarización y Validación: Existe un esfuerzo continuo para estandarizar y validar estos métodos en los laboratorios forenses, asegurando que los resultados obtenidos sean reproducibles y confiables. Esto es crucial para garantizar la integridad de las pruebas presentadas en un proceso judicial.

En resumen, la justificación para investigar y aplicar umbrales diferenciales de extracción para la detección de espermatozoides en muestras forenses radica en su capacidad para proporcionar evidencia científica robusta y confiable, que puede ser crucial para resolver casos criminales y administrar justicia de manera precisa y equitativa.

DESARROLLO Y CONTENIDO:

La utilización de umbrales de extracción diferencial (UED) para reducir la existencia de espermatozoides en muestras de casos forenses es una técnica relativamente nueva que ha ganado popularidad en los últimos años. Su desarrollo se basa en la necesidad de aislar el ADN de los espermatozoides de otros componentes del semen, como células sanguíneas o microorganismos, que pueden interferir con los análisis genéticos.

Los primeros estudios sobre UED se remontan a la década de 1990, cuando se exploraron diferentes métodos para separar los espermatozoides de las células sanguíneas. Uno de los métodos más prometedores fue la ultracentrifugación en gradiente de densidad, que permite separar los componentes del semen en función de su tamaño y densidad.

En la década de 2000, se desarrollaron métodos de extracción diferencial más específicos basados en las propiedades moleculares de los espermatozoides. Estos métodos aprovechan la presencia de proteínas o antígenos específicos en la superficie de los espermatozoides para capturarlos y separarlos de otros componentes del semen.

Actualmente, la utilización de UED se ha convertido en una herramienta valiosa en el análisis forense de agresiones sexuales. Permite obtener perfiles de ADN de espermatozoides con mayor precisión y sensibilidad, lo que facilita la identificación de los agresores y la resolución de los casos.

- La utilización de UED es fundamental para la resolución de casos de agresiones sexuales y para la identificación de los agresores.

El análisis de las pruebas en un supuesto caso de agresión sexual no solo pretende responder a la pregunta de quién estuvo involucrado, sino que también busca responder a la pregunta de qué fuente biológica proporcionó el ADN. Puede ser difícil obtener datos serológicos positivos en muestras difíciles, como artículos

lavados, muestras de ADN de bajo nivel o hisopos de kits de agresión sexual obtenidos después de un intervalo prolongado desde el momento de la agresión.

Para obtener esta información se pretenden utilizar diferentes pruebas tanto de extracción de ADN como pruebas serológicas

La extracción de ADN a partir de muestras de semen es un procedimiento fundamental en la genética forense. La elección de la técnica dependerá de diversos factores, como la cantidad y calidad de la muestra, la presencia de inhibidores y los recursos disponibles en el laboratorio.

Entre las pruebas serológicas que se utilizaran tenemos:

Presuntivas:

- **Prueba de la Amilasa:** La prueba de amilasa es una técnica comúnmente utilizada en genética forense para detectar la presencia de saliva en muestras de evidencia. La amilasa es una enzima presente en la saliva que descompone el almidón. Esta técnica utiliza un sustrato que cambia de color en presencia de amilasa. Al identificar la amilasa en una mancha o superficie, los forenses pueden determinar si la saliva estuvo presente en ese lugar, lo que a su vez puede permitir encontrar células del epitelio bucal y puede proporcionar pistas importantes sobre un crimen.
- **Fosfatasa Ácida:** La prueba de fosfatasa ácida es una prueba presuntiva fundamental en genética forense, empleada para detectar la posible presencia de semen. La fosfatasa ácida es una enzima que se encuentra en altas concentraciones en el semen, específicamente en la próstata. -La prueba se basa en la capacidad de la fosfatasa ácida de catalizar una reacción química que produce un cambio de color. Si la muestra contiene fosfatasa ácida, se producirá una coloración (azul), lo que indica la probable presencia de semen.

Confirmatorias:

- Prueba de Antígeno Prostático (PSA): El PSA es una proteína producida exclusivamente por la glándula prostática. Se encuentra en altas concentraciones en el semen, en el ámbito forense, su utilidad radica en la identificación del semen en muestras de evidencia.

La prueba de PSA se realiza mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), que detecta específicamente la proteína PSA. Esta prueba es altamente sensible y específica, lo que significa que puede detectar pequeñas cantidades de PSA.

- Prueba de la Proteína 30 (p30): Un Marcador Específico de Semen

La prueba de la proteína P30 es una técnica fundamental en genética forense, específicamente diseñada para la detección de líquido seminal. La proteína P30 es una proteína específica del antígeno prostático, lo que significa que se encuentra en altas concentraciones en el semen y es casi exclusiva de este fluido corporal.

La prueba de P30 se realiza mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), que detecta específicamente la proteína P30. Esta prueba es altamente sensible y específica, lo que significa que puede detectar pequeñas cantidades de P30.

- Coloración de Christmas Tree: La tinción de Christmas Tree (Árbol de Navidad) es una técnica de coloración diferencial utilizada en espermatología forense para visualizar de manera detallada las diferentes estructuras de un espermatozoide. Esta técnica resulta especialmente útil en casos de agresión sexual, donde la identificación y cuantificación de espermatozoides en muestras biológicas es fundamental para la resolución de un caso.

La técnica de tinción de Christmas Tree utiliza dos o más colorantes que se unen a diferentes componentes del espermatozoide. Los colorantes más utilizados son: colorante nuclear que se une a la cabeza del espermatozoide (contiene el núcleo y la mayor parte del ADN) y el colorante citoplasmático

se une a la pieza intermedia y a la cola del espermatozoide, que contienen las mitocondrias y otras organelas.

Toma de muestras:

La recolección de muestras de sujetos humanos se realizó de acuerdo a las normas establecidas, dando para ello su consentimiento informado. Cada uno de los veinte donantes masculinos proporcionó un juego de hisopos bucales y cutáneos. Los hisopos cutáneos se recolectaron del antebrazo del donante utilizando un hisopo de algodón (Puritan® Medical Products, Guilford, ME) humedecido con agua esterilizada. Se recolectaron diez muestras de saliva fresca en recipientes estériles de donantes masculinos. Se solicitaron muestras de semen fresco, nunca congelado, hisopos vaginales y ropa interior femenina, ocho donantes de semen no estaban vasectomizados y dos sí. El semen de hombres no vasectomizados se mencionará como semen en todo el documento, mientras que el semen vasectomizado se especificará como tal. Cinco donantes tomaron muestras vaginales (diez por persona) con hisopos de rayón al menos 72 horas después de la relación sexual. Las muestras de ropa interior se usaron durante al menos ocho horas antes de la toma y fueron proporcionadas por cinco donantes diferentes de entre 18 y 51 años. Las donantes no estaban menstruando en el momento de la toma y se habían abstenido de tener relaciones sexuales al menos 72 horas antes de la toma.

El tiempo para realizar exámenes de laboratorio en casos de agresión sexual es crítico para la eficacia de la recolección de pruebas. En general, se recomienda realizar estos exámenes lo antes posible después de la agresión para asegurar la máxima precisión en la recolección de evidencia.

El tiempo ideal para realizar los exámenes es dentro de las primeras 72 horas idealmente. Este período es crucial porque la evidencia biológica, como los fluidos corporales, puede ser más fácilmente recolectados y preservados.

Preparación de la muestra de hisopo:

Los hisopos de algodón o los hisopos vaginales recolectados previamente se cortaron en dos mitades y cada mitad se colocó en un tubo estéril. Se pipeteó una alícuota de 50 μ L de semen líquido o saliva (puro o diluido 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10k) sobre el corte de hisopo para crear muestras de saliva o semen de una sola fuente y mezclas de saliva o semen con hisopos vaginales. Para las mezclas de saliva/semen en hisopos de algodón o vaginales, las muestras de semen se pipetearon primero y las muestras de saliva, que se recolectaron más tarde, se pipetearon en la parte superior. Cada hisopo se colocó en una tapa con el tubo abierto hasta que la muestra se secó antes de sellar el tubo hasta que se procesó la muestra. Se crearon conjuntos de dilución a partir de cinco donantes de saliva, tres donantes de semen no vasectomizados y dos donantes de semen vasectomizados, tanto en hisopos de algodón como vaginales. Se generaron mezclas a partir de tres donantes de saliva y tres donantes de semen no vasectomizados, en las que un líquido era puro y el otro puro o diluido, como se indicó anteriormente.

Preparación de la muestra lavada:

Se compró nueva, una tela de algodón tejida, similar al material que se usa en la entrepierna, se cortaron cuadrados de tela de algodón de 5 \times 5 pulgadas y se dibujó un círculo. Luego, cada muestra de tela se trató con rayos UV para reducir aún más la posibilidad de amplificación del ADN de fondo. Se pipeteó una muestra de saliva o semen sin diluir en el centro del círculo. Se generaron cuatro muestras de cada uno de los cinco donantes por fluido. La tela se secó en una campana y cada muestra se colocó en un sobre estéril separado hasta el lavado.

Las secreciones vaginales en la ropa interior femenina usada se visualizaron a simple vista o utilizando una fuente de luz alternativa y se delinearon con un marcador permanente. El semen de cada uno de los cinco donantes utilizados en las muestras de tela se diluyó 1:10 y se pipetearon 500 μ L de un solo donante en el centro de la mancha de secreción vaginal en la entrepierna de la ropa interior. El área de la mancha de semen se delineó con un marcador permanente. Una vez

seca, el área de la entrepierna correspondiente a las manchas vaginales y de semen superpuestas se dividió en cuatro cuadrantes aproximadamente iguales que se utilizaron para tomar muestras antes y después del lavado utilizando diferentes técnicas de muestreo.

Antes del lavado, se recogió un hisopo de cada conjunto de donante de tela y se tomaron dos muestras, una de hisopo y otra de corte. Las tres muestras de tela restantes para cada tipo de fluido se lavaron como se indicó anteriormente, emparejando la ropa interior y la tela manchada con semen del mismo donante e incluyendo solo un donante (saliva o semen) por carga de lavado. Cada carga también incluyó un cuadrado en blanco de tela de algodón que se muestreo y procesó después del lavado para evaluar la posible transferencia.

Se establecieron perfiles de referencia para todos los donantes utilizando una pequeña muestra de un tipo de muestra por donante. La concentración de ADN se determinó utilizando el kit de cuantificación Quantifiler™ Trio (Applied Biosystems™, y luego se amplificó con el kit de amplificación por PCR GlobalFiler™ (Applied Biosystems™). Las muestras se analizaron en el analizador genético 3500XL (Applied Biosystems™). Los datos se analizaron utilizando OSIRIS (Institutos Nacionales de Salud, dominio público) y ArmedXpert™ (NicheVision, Akron, OH). Se utilizaron perfiles de referencia para evaluar las proporciones de la mezcla.

Todas las muestras se procesaron utilizando el protocolo de extracción diferencial validado de USACIL:

Generalmente, los protocolos de extracción en laboratorios forenses involucran los siguientes pasos:

1. **Recepción de la evidencia:** La evidencia es recibida y documentada de manera cuidadosa para mantener la cadena de custodia.
2. **Examen inicial:** Se realiza un examen visual y preliminar de la evidencia para determinar el tipo de análisis necesario.
3. **Selección del solvente:** Se elige un solvente adecuado en función del tipo de sustancia que se busca extraer.

4. **Preparación de la muestra:** La muestra se prepara para la extracción, lo que puede incluir trituración, homogeneización o filtración.
5. **Extracción:** Se lleva a cabo el proceso de extracción utilizando el solvente seleccionado.
6. **Purificación:** El extracto se purifica para eliminar cualquier interferencia que pueda afectar los análisis posteriores.
7. **Análisis:** El extracto se analiza utilizando técnicas instrumentales.
8. **Interpretación de resultados:** Los resultados se interpretan y se genera un informe.

Procedimiento de extracción diferencial de muestras utilizadas para deducir la existencia de espermatozoides:

Brevemente, se agregaron los agentes de lisis iniciales sobre la muestra y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. El hisopo o el corte de muestra se retiró. Después de completar la primera parte del protocolo diferencial automatizado, se eliminó F1 y después de la adición de 400 µl de tampón, el ADN se purificó siguiendo el protocolo de gran volumen, eluyendo el ADN en 50 µL de tampón TE. Después de la segunda parte del protocolo diferencial automatizado, se eliminó F2, se resuspendió el sedimento de esperma y se preparó un portaobjetos de esperma. La muestra restante se lisó utilizando tampón G2 (Qiagen®) y ditiotreitól (DTT), y el ADN se purificó utilizando el protocolo Trace en el EZ1® Advanced XL, eluyendo el ADN en 50 µL de tampón TE. Todas las muestras F2 que contenían un solo donante masculino y una selección de muestras F1 que se esperaba que tuvieran bajas cantidades de ADN se secaron luego utilizando un Eppendorf® Vacufuge® plus (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania) y se resuspendieron en agua esterilizada. Las muestras F2 del primer conjunto de mezclas de saliva/semen y la muestra 10k:1 del segundo donante en hisopos de algodón también se aspiraron al vacío. El resto de las mezclas de saliva/semen, incluidas todas las muestras en hisopos vaginales, no se concentraron en función de los altos valores de cuantificación de ADN masculino obtenidos del conjunto original. Todas las muestras F2 que no fueron sometidas a concentración tenían cantidades superiores al rango estocástico de nuestro

laboratorio y tenían más de 200 pg de ADN masculino en F2. Las muestras se cuantificaron luego utilizando el kit de cuantificación Quantifiler Trio y mezclas (ver anexo 1), y las muestras lavadas seleccionadas con al menos 25 pg de ADN masculino se amplificaron con el kit de amplificación por PCR GlobalFiler™ (ver anexo 2). Después de la amplificación, las muestras se analizaron en el analizador genético 3500XL (ver anexo 3). Los datos se analizaron utilizando OSIRIS y ArmedXpert™.

Pruebas serológicas:

Las pruebas serológicas se realizaron de acuerdo con los protocolos de pruebas de semen de USACIL:

Un pequeño corte del hisopo original se sometió a una prueba de AP (Antígeno Prostático) con reactivo AP (Antígeno Prostático), diluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La prueba de la proteína30 (P30) se realizó a partir del mismo corte utilizado para la prueba Antígeno Prostático (AP) utilizando las tarjetas de prueba PSA Semiquant (ver anexo 4) y el tampón (SERATEC®, Goettingen, Alemania). Los portaobjetos de esperma creados durante el proceso de extracción diferencial se tiñeron con Christmas Tree Stain (SERI) y se visualizaron los portaobjetos para detectar la presencia de espermatozoides. Si la microscopía diferencial de portaobjetos no confirmaba la presencia de espermatozoides, se preparaba y analizaba un portaobjetos adicional a partir del corte utilizado para la prueba AP/P30. Las muestras que arrojaron resultados positivos de Antígeno Prostático y Proteína30 o para las que se visualizaron espermatozoides se consideraron positivas para el semen. Las muestras para las que solo Proteína30 fue positivo se consideraron no concluyentes. Las muestras para las que solo Antígeno Prostático fue positivo, o las tres pruebas fueron negativas, se registraron como negativas para el semen.

Marco conceptual

Agresión sexual: acto de violencia sexual en el que una persona involucra a otra en actividades sexuales sin su consentimiento o cuando la víctima no está en condiciones de dar un consentimiento válido.

Antígeno específico de próstata (PSA) también conocido como p30: que es una proteína producida en la próstata y secretada en el líquido seminal.

Análisis forense de ADN: es una rama de la ciencia forense que se centra en el uso de material genético en la investigación criminal. Ayuda en la resolución de crímenes humanos como violación y asesinato, entre otros.

ADN de fondo: se refiere a la presencia de material genético en una escena del crimen que no está directamente relacionado con el delito en cuestión. Este ADN puede provenir de personas que han tenido contacto previo con la escena, como policías, técnicos de laboratorio, o incluso de la propia víctima antes del suceso.

Analizador de datos OSIRIS: es una plataforma de software que integra múltiples bases de datos, proporcionando a los investigadores un acceso unificado a una amplia gama de información. Se ha convertido en un recurso invaluable para aquellos que buscan realizar análisis de datos a gran escala y de alta complejidad. OSIRIS conecta diversas fuentes de información, como RepRisk, Compustat, MSCI y muchas más. Esto permite a los investigadores realizar análisis comparativos y multidimensionales.

Células espermáticas del semen: son células patognomónicas o propias del semen. En el contexto del análisis seminal, la identificación de estas células puede ser crucial para el diagnóstico de diversas enfermedades, infecciones o alteraciones que afectan la fertilidad masculina. Se forman y desarrollan en los túbulos seminíferos y se almacenan en el epidídimo. Están formados por una cola o flagelo que les ayuda a moverse y una cabeza o núcleo que contiene toda la información genética que el padre va a heredar a su hijo.

Contaminación de muestras: es uno de los principales desafíos que enfrentan los laboratorios de genética forense y molecular. Se refiere a la presencia de material genético no deseado en una muestra que puede llevar a conclusiones erróneas.

Cuartil: El cuartil es una medida que divide un conjunto de datos ordenados en cuatro segmentos iguales. Cada cuartil muestra un valor específico bajo el cual cae un cierto porcentaje de los datos.

En otras palabras, el cuartil es un término utilizado en estadística que se refiere a los valores que dividen un conjunto de datos, ordenados de menor a mayor, en cuatro partes iguales.

El primero (Q1) engloba el 25% de los datos inferiores del conjunto, el segundo (Q2), también conocido como la mediana, divide el conjunto en mitades iguales, y el tercero (Q3) abarca hasta el 75% de los datos, dejando el 25% superior por encima de este.

Deducir: Implica llegar a conclusiones sólidas y científicamente válidas a partir de la evidencia de ADN encontrada en una escena del crimen. Es un proceso que combina la aplicación de conocimientos científicos, técnicas de laboratorio y un riguroso razonamiento lógico.

Degradación de muestras: La degradación de muestras ocurre cuando las largas cadenas de ADN se fragmentan en pedazos más pequeños, lo que dificulta o imposibilita su análisis. La degradación del ADN tiene varias consecuencias negativas para el análisis genético: **Dificultad en la amplificación por PCR**, **Reducción de la calidad de los perfiles genéticos** (incompletos o presentar picos de baja intensidad que dificulta su interpretación), **Falsos negativos** (casos extremos, el ADN puede estar tan degradado que no se pueda obtener ningún perfil genético).

Extracción diferencial: Una de las técnicas más empleadas para el aislamiento de espermatozoides en los casos de agresiones sexuales es la extracción diferencial (DE). Este método se basa en el aislamiento de información genética del agresor a

partir de las características químicas de los espermatozoides y las células epiteliales.

Fosfatasa ácida: técnica establecida para detectar semen. Esta enzima segregada por la próstata es encontrada en las más altas concentraciones en el fluido seminal, que en cualquier otra parte del cuerpo.

Fracción uno (F1) o también llamada Fracción Femenina (FF): consiste principalmente en ADN de células no espermáticas fáciles de lisar, suelen ser las células epiteliales vaginales (sobre todo en hisopos vaginales)

Fracción dos (F2) o también llamada Fracción Masculina (MF): consiste principalmente en ADN de células espermáticas difíciles de lisar

Isoenzimas séricas: Las isoenzimas son variantes de una misma enzima que catalizan la misma reacción química, pero difieren en su estructura molecular. Estas pequeñas diferencias pueden ser detectadas mediante análisis de laboratorio y proporcionan información valiosa sobre el estado de salud de un individuo. Cuando hablamos de isoenzimas séricas, nos referimos a aquellas que circulan en el suero sanguíneo

Microfluídica: La microfluídica es una actividad de reciente aparición y sus características fundamentales son el empleo y control de pequeños volúmenes (líquidos o gaseosos) y la multidisciplinaria complejidad de los principios físicos y los dispositivos empleados.

Perfil genético: también conocido como huella genética o ADN fingerprinting, es una representación única del material genético de un individuo. Es como un código de barras biológico que identifica a una persona de manera inequívoca, a excepción de los gemelos idénticos que comparten el mismo ADN. Para obtener un perfil genético se realiza un análisis de una muestra biológica, como sangre, saliva, cabello con raíz o cualquier tejido que contenga células con núcleo. A partir de esta muestra se extrae el ADN y se analizan ciertas regiones del genoma que son altamente variables entre individuos. Estas regiones, conocidas como

marcadores genéticos, son como pequeñas secuencias de ADN que se repiten un número variable de veces. Al comparar el número de repeticiones de estos marcadores en diferentes personas, se puede establecer un perfil genético único.

Picogramos (pg): es una unidad de medida utilizada para cuantificar masas extremadamente pequeñas. En el sistema internacional de unidades (SI), un picogramo es igual a una billonésima parte de un gramo.

Precisión: se refiere a la capacidad de obtener resultados muy similares al repetir la misma prueba en múltiples ocasiones en una misma muestra. Es decir, mide qué tan consistentes son los resultados entre sí.

Pruebas presuntivas: son un conjunto de técnicas rápidas y sencillas que se utilizan para determinar si una mancha o muestra biológica podría contener un fluido corporal de interés forense, como semen, sangre, saliva. Estas pruebas son cruciales en la escena del crimen, ya que permiten al investigador identificar rápidamente las áreas que requieren un análisis más detallado.

Pruebas confirmativas: Una vez que las pruebas presuntivas indican la posible presencia de un fluido biológico en una escena del crimen, se procede a realizar pruebas confirmatorias. Estas pruebas tienen como objetivo confirmar la naturaleza de la muestra y, lo más importante, poder obtener un perfil genético que permita identificar a la persona a la que pertenece.

Rango estocástico: En el análisis de perfiles genéticos se refiere a la zona donde ya podemos tener pérdidas de información genética(alélos),

Repetibilidad: se refiere a la capacidad de obtener los mismos resultados cuando se analiza la misma muestra en múltiples ocasiones, bajo las mismas condiciones y por diferentes analistas.

Reproductibilidad: Se refiere a la consistencia de los resultados cuando se analiza la misma muestra en diferentes laboratorios. Garantiza que los resultados obtenidos sean confiables y comparables a nivel internacional, lo que fortalece la credibilidad de la evidencia genética en los tribunales y contribuye a una mayor justicia.

Resultados confiables: Los resultados confiables en genética forense son el pilar fundamental sobre el cual se construyen las investigaciones criminales y las pruebas de paternidad. Cuando hablamos de resultados confiables, nos referimos a aquellos que son precisos, reproducibles y válidos, es decir, que reflejan de manera exacta la realidad biológica de la muestra analizada.

Semen: El semen es un líquido biológico de color blanco, que tiene un aspecto viscoso y que contiene las células reproductivas masculinas llamadas espermatozoides. Este líquido está compuesto por espermatozoides secretados por los testículos, por un líquido seminal secretado por las vesículas seminales y por un líquido de origen prostático.

Serología forense: Es el término que se utiliza para identificar la disciplina científica que identifica a los fluidos del cuerpo. El estudio de los fluidos biológicos o corporales (sangre, semen, saliva, sudor, lagrimas, humor vitreo, etc.), se realiza con el fin de establecer su identificación, pertenencia y correlaciones entre víctima, sospechoso y la escena del crimen. Es forense desde el momento que se enfoca a la actividad jurídica y por lo tanto tiene valor legal.

Sensibilidad: se refiere a su capacidad para detectar correctamente la presencia de una sustancia o marcador genético específico cuando realmente está presente. En otras palabras, mide qué tan bien la prueba detecta lo que está buscando.

STR: Son segmentos de ADN en los que una secuencia corta de nucleótidos se repite varias veces en tándem (bloques). Estas repeticiones cortas pueden variar en número entre individuos, y esta variabilidad es muy útil en estudios genéticos.

Testigo experto o perito: Es un individuo con conocimientos especializados en un área particular. Su papel es fundamental para ayudar al juez y al jurado a comprender mejor los hechos del caso y a llegar a una decisión justa.

Umbral diferencial: en relación a las pruebas de extracción, se refiere a la capacidad del método de separar las células femeninas de las masculinas.

En El Salvador, el proceso para la realización de solicitudes de laboratorio en casos de agresión sexual está regido por una combinación de leyes, protocolos y

directrices específicas que buscan asegurar la adecuada atención y documentación de las pruebas forenses.

Código Penal de El Salvador:

El Código Penal, en sus artículos sobre delitos sexuales, no detalla explícitamente los procedimientos para la realización de exámenes de laboratorio, pero establece que la violencia sexual es un delito que debe ser investigado y probado

Entre los delitos sexuales tipificados en la legislación salvadoreña se encuentran:

- **Violación:** El acceso carnal sin el consentimiento de la víctima.
- **Abuso sexual:** Actos sexuales con una persona menor de edad o con una persona incapaz de consentir.
- **Acoso sexual:** Conducta sexual indeseada que crea un ambiente hostil o ofensivo.
- **Explotación sexual:** Utilizar a una persona para obtener beneficio económico o satisfacción sexual.
- **Pornografía infantil:** Producción, distribución o posesión de material pornográfico que involucre a menores de edad.

En el contexto forense, la utilización de umbrales de extracción diferencial para deducir la existencia de espermatozoides en muestras tiene implicaciones legales significativas. algunos aspectos importantes del marco legal son los siguientes:

Estándares de prueba: Los estándares para la admisibilidad de pruebas forenses varían según la jurisdicción. Es crucial que cualquier técnica utilizada para determinar la presencia de espermatozoides cumpla con los requisitos legales de fiabilidad y exactitud.

La cadena de custodia tiene el objetivo de evitar que la evidencia sea alterada, contaminada o que se cometa un error en la identificación de la misma, ya sea que

se trate de sustancias, documentos o cualquier otro elemento relacionado directa o indirectamente con el delito o con circunstancias del mismo.

De lo que se desprende que, en lo que se refiere al procedimiento de aseguramiento de evidencia, se cumple con la cadena de custodia registrando la información necesaria para constatar la autenticidad de la evidencia, lo que supone que se deje constancia de los datos que rodean su recolección, embalaje, transporte, análisis y custodia.

Los protocolos utilizados en la extracción y análisis de espermatozoides deben cumplir con estándares rigurosos para garantizar la integridad de la evidencia en el proceso legal.

Admisibilidad y testimonio de expertos: En procedimientos judiciales, los expertos forenses que utilizan técnicas como los umbrales de extracción diferencial pueden ser llamados a testificar sobre la validez y la interpretación de los resultados. Es esencial que estos expertos estén debidamente capacitados y que puedan explicar claramente los métodos utilizados y sus conclusiones.

RESULTADOS

INDICADORES: MUESTRA DE SALIVA, SEMEN

SEMEN:

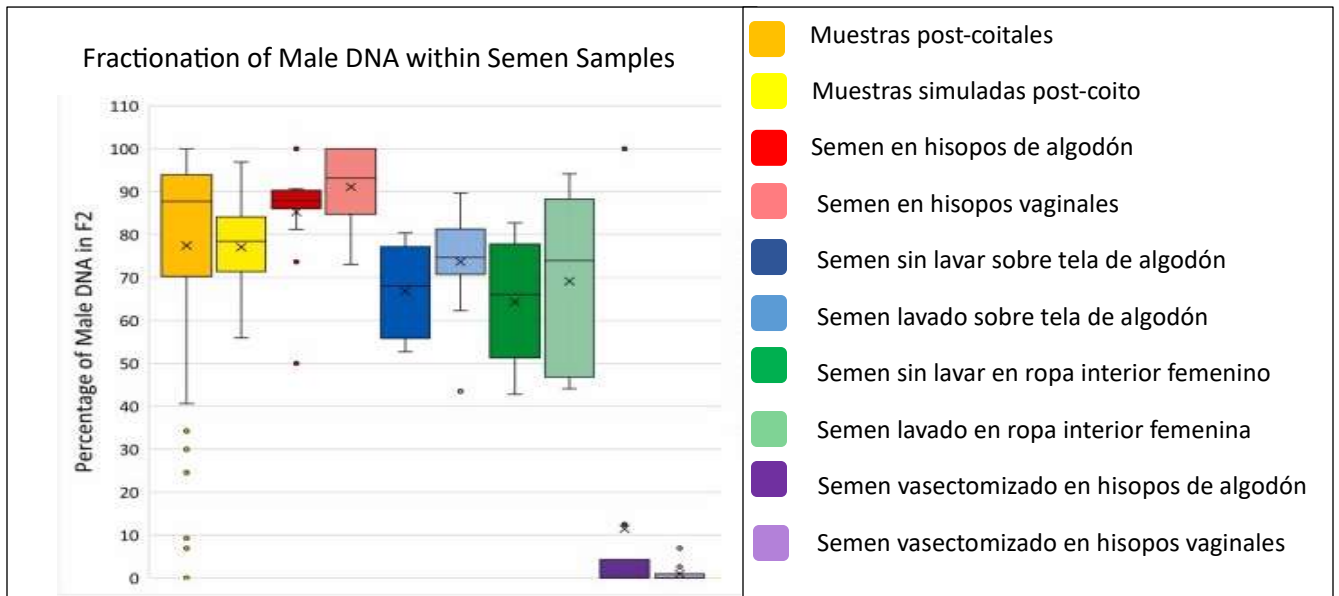


Fig. 2. Diagrama de cajas del fraccionamiento del ADN masculino en muestras de semen. Las cajas representan el primer y tercer cuartil; la línea central es el valor mediano y los símbolos "X" representan el fraccionamiento porcentual promedio para todas las muestras dentro de la categoría. Los valores atípicos se representan como puntos fuera del rango de la caja y de los bigotes.

La distribución de los porcentajes de fraccionamiento del ADN masculino para muestras no seminales se proporciona en Fig. 3

El porcentaje más alto de ADN masculino observado en F2 (36,4%) se encontró en una sola muestra de hisopo de piel, pero este punto de datos no se muestra en el gráfico para permitir una mejor visualización de los puntos de datos restantes. Después de la extracción diferencial, esta muestra de hisopo de piel tenía un total de 65,8 pg de ADN masculino total en F2. Unas pocas muestras de saliva depositadas en hisopos de algodón, hisopos vaginales y en tela de algodón lavada

también tuvieron tasas algo elevadas de fraccionamiento de ADN masculino en F2, en comparación con los datos promedio para estos tipos de muestras, pero todas cayeron por debajo del 10%.

Nuestros hallazgos indican que, si bien el porcentaje de ADN masculino en F2 es un buen indicador de la fuente del ADN y muchas muestras que contienen esperma proporcionan mucho más del 50% del ADN masculino en F2, existe un riesgo de falsos positivos para muestras con ADN masculino muy bajo debido a la naturaleza estocástica de los valores de cuantificación en estos rangos bajos. El uso de un umbral basado en cantidades, que no se puede visualizar en estos gráficos, ayuda a reducir este riesgo, pero puede dar lugar a falsos negativos.

MUESTRA SALIVA:

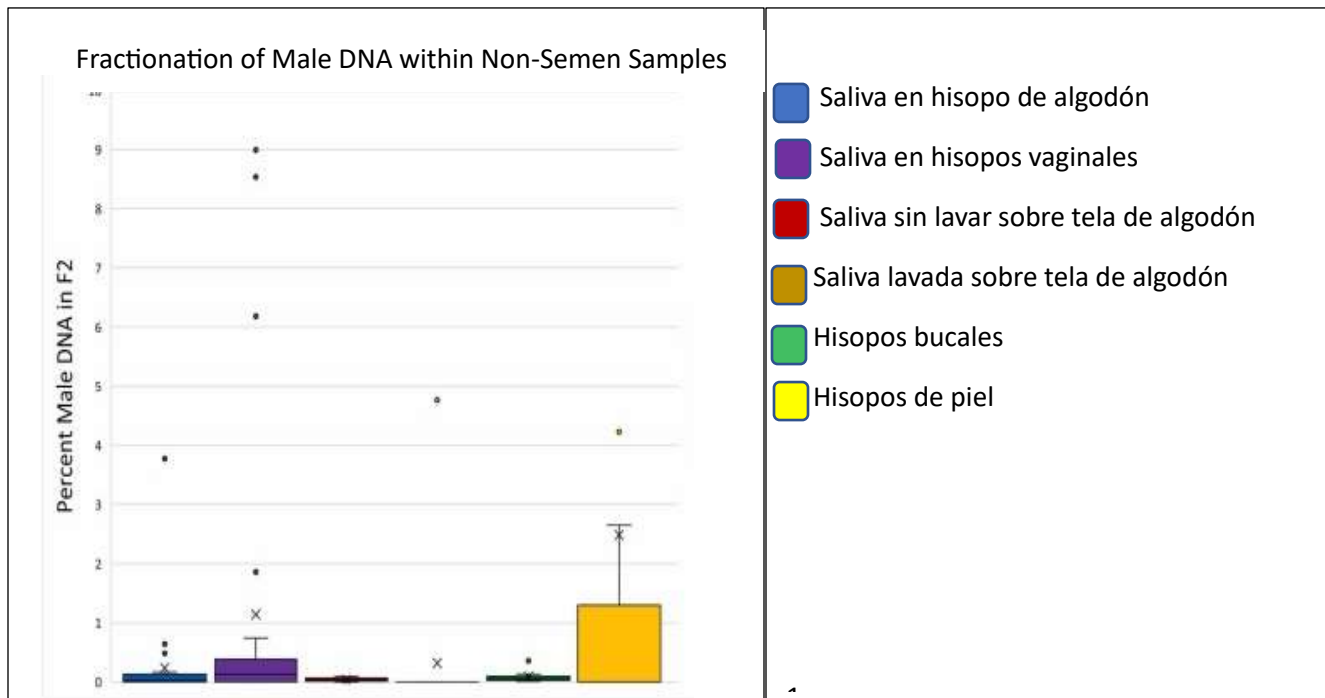


Fig. 3. Diagrama de cajas del fraccionamiento del ADN masculino en muestras que no son de semen, escalado al 10 % para permitir una mejor visualización de los datos. Las cajas representan el primer y tercer cuartil; la línea central es el valor mediano y los símbolos "X" representan el fraccionamiento porcentual promedio para todas las muestras dentro de la categoría. Los valores atípicos se representan como puntos fuera del rango de la caja y del bigote. Un valor atípico con el 36,4 % del

ADN masculino total en F2 del conjunto de datos de hisopado cutáneo no se representa gráficamente.

La comparación del semen en muestras de hisopo de algodón y el semen en muestras de hisopo vaginal no reveló ninguna diferencia clara en el fraccionamiento del semen en presencia de secreciones vaginales. Sin embargo, el porcentaje de fraccionamiento promedio de las muestras de saliva aumentó al 1,1 % en presencia de secreciones vaginales en comparación con el 0,2 % cuando no había secreciones vaginales presentes, lo que indica un impacto potencialmente menor de las secreciones vaginales en el fraccionamiento del ADN salival. Alderson et al. informaron un hallazgo similar de un enriquecimiento del fraccionamiento del ADN salival en F2 en presencia de secreciones vaginales

Actualmente se desconoce la causa del aumento nominal en el fraccionamiento del ADN salival masculino en F2 cuando se acompaña de secreciones vaginales. Sin embargo, se especula que la competencia por los reactivos entre la cantidad significativa de células vaginales femeninas y células salivales durante el paso de lisis inicial, dejando algunas de las células salivales masculinas intactas después de la lisis inicial, puede contribuir a esta observación. Además, debido a la alta renovación celular dentro de la cavidad oral, las células dentro de la saliva pueden ser más resistentes a la lisis que las células vaginales, lo que da como resultado que las células vaginales se lisen preferentemente dentro del tampón de lisis inicial, lo que permite el arrastre de células salivales a F2. Sin embargo, el grado de enriquecimiento del ADN salival en F2 sigue siendo mínimo en comparación con el enriquecimiento observado en muestras que contienen esperma y no se espera que cause confusión entre las dos fuentes de ADN masculino cuando se utiliza un enfoque cuantitativo para las pruebas serológicas.

Las muestras que contenían solo semen como fuente de ADN masculino, que tenían una fracción significativa de ADN masculino en F2, pero tenían una cantidad reducida de ADN masculino en esa fracción, se originaron principalmente a partir de muestras de semen diluidas 1:10k, muestras post-coitales a intervalos de recolección extendidos y muestras lavadas. Las mezclas de semen/saliva también

tuvieron fraccionamiento variable de ADN masculino según la cantidad de semen en cada muestra. Para estas mezclas, el porcentaje de ADN masculino en F2 se redujo a medida que se diluyó el componente de semen.

Se observó una variación significativa en el fraccionamiento de las muestras poscoitales. En intervalos de recolección ≥ 48 horas, la cantidad de ADN masculino en F2 se redujo apreciablemente, mientras que el porcentaje de ADN masculino encontrado en F2 fue generalmente alto. Cuatro muestras poscoitales proporcionaron cantidades significativas de ADN masculino en F2, pero se observó menos del 50% del ADN masculino total en F2. Las muestras de dos parejas donantes proporcionaron un porcentaje reducido de fraccionamiento de ADN masculino en F2. Las muestras del donante 8, que proporcionó muestras en todos los puntos temporales, y del donante 12, que solo proporcionó una muestra poscoital de 24 horas, tenían rutinariamente menos del 50% del ADN masculino en F2. La causa de los porcentajes de fraccionamiento reducidos en estas muestras no está clara; sin embargo, puede haberse debido a un recuento de espermatozoides reducido, una integridad estructural inherentemente menor de los espermatozoides de estos donantes o un entorno potencialmente más hostil dentro del canal vaginal de las parejas femeninas, tal vez debido a una infección bacteriana o por levaduras, los cuales podrían resultar en una lisis prematura de los espermatozoides en F1. Además, dos muestras poscoitales no proporcionaron ADN masculino en ninguna de las fracciones. Es probable que esas muestras sean el resultado de una recolección inadecuada del donante.

CONCLUSIONES:

Ventajas y Potencialidades:

- Mayor sensibilidad: Los umbrales de extracción diferencial permiten detectar cantidades mínimas de espermatozoides, incluso en muestras degradadas o mezcladas con otros fluidos biológicos.
- Especificidad: Al ajustar los parámetros de extracción, se puede aumentar la especificidad de la prueba, reduciendo el riesgo de falsos positivos.
- Automatización: La técnica puede ser automatizada, lo que agiliza el proceso y reduce la variabilidad entre diferentes analistas.
- Cuantificación: En algunos casos, puede permitir estimar la cantidad de espermatozoides presentes en la muestra.

Desafíos y Limitaciones:

- Optimización: La elección del umbral óptimo puede variar dependiendo de la naturaleza de la muestra y de los objetivos de la investigación.
- Inhibidores: La presencia de sustancias inhibidoras en la muestra puede afectar la eficiencia de la extracción.
- Degradación del ADN: El ADN de los espermatozoides puede estar degradado, lo que dificulta la obtención de un perfil genético completo.
- Contaminación: Es fundamental evitar la contaminación de las muestras durante el proceso de extracción y análisis.

Implicaciones Forenses:

- Fortalecimiento de la evidencia: La detección de espermatozoides mediante umbrales de extracción diferencial proporciona una evidencia sólida en casos de agresión sexual y otros delitos sexuales por lo que es importante que los peritos encargados de las tomas de muestras estén calificados.
- Resolución de casos complejos: Permite resolver casos en los que la cantidad de material seminal es limitada o la muestra está mezclada con otros fluidos biológicos.

- Justicia: Contribuye a garantizar una justicia más rápida y eficaz para las víctimas de delitos sexuales.

En conclusión, la utilización de umbrales de extracción diferencial representa un avance significativo en el campo de la genética forense. Sin embargo, es importante seguir investigando y desarrollando esta técnica para superar sus limitaciones y maximizar su potencial.

ANEXOS

Anexo 1

kit de cuantificación Quantifiler Trio y mezclas



Permite la evaluación cuantitativa y cualitativa del ADN total humano y ADN masculino en una única reacción de PCR Tiempo Real. Cuenta con una química mucho más sensible, detecta hasta 0.3 pg de ADN

Anexo 2

kit e amplificación por PCR GlobalFiler



Son kits de análisis de repetición corta en tándem (STR) de 24 loci y 6 colorantes que combinan la máxima compatibilidad con los estándares de loci de bases de datos globales con un tiempo de amplificación drásticamente reducido y un poder de discriminación superior, lo que permite a los laboratorios una eficiencia general mejorada.

Anexo 3

Analizador genético 3500XI



El analizador genético 3500XI es un sistema de análisis de ADN basado en fluorescencia que utiliza tecnología probada de electroforesis capilar con 24 capilares

Anexo 4

Prueba PSA Semiquant



Poster



"Utilización de umbrales de extracción diferencial para deducir la existencia de espermatozoides en muestras de casos de agresión sexual"

Campos Chicas, Aurora Aydee
Díaz Orellana, Ana Eudelia
Pineda Granados, Glenda Sarahi

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EL SALVADOR

I- INTRODUCCION

Evaluar la fuente celular del ADN obtenido de elementos de prueba en supuestos casos de agresión sexual puede proporcionar información importante para los investigadores, en particular cuando la víctima y el acusado son conocidos. Las pruebas de agresión sexual suelen incluir muestras internas y externas obtenidas del cuerpo de la víctima después de la supuesta agresión sexual. Si se sospecha que la muestra contiene líquido seminal, las pruebas suelen someterse a extracción diferencial y pruebas serológicas. Las pruebas serológicas suelen incluir la visualización de células espermáticas mediante microscopía, así como pruebas de componentes del líquido seminal.

II- MATERIALES Y METODOS

- Kits de agresión sexual
- kits de cuantificación Quantifier Trio
- Tarjetas de prueba PSA Semiquant
- Preparación de muestras lavadas
- Métodos de cuantificación para la extracción diferencial que evalúa el fraccionamiento del ADN masculino
- Métodos serológicos tradicionales para detectar la presencia de espermia



III. METODOLOGIA

VARIABLES:

- Semen
- Saliva
- Hisopados vaginales
- Hisopados bucales
- Hisopos de mezclas vaginales, bucales y semen
- Ropa interior femenina lavada

PROCEDIMIENTOS:

- La recolección de muestras
- Preparación de la muestra de hisopo
- Preparación de la muestra lavada
- Procedimiento de extracción diferencial de muestras utilizadas
- Procedimiento de pruebas serológicas

IV- RESULTADOS

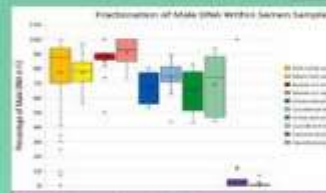


Fig. 1. Diagrama de cajas del fraccionamiento del ADN masculino en muestras de semen.

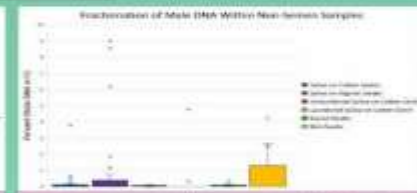


Fig. 2. Diagrama de cajas del fraccionamiento del ADN masculino en muestras que no contienen semen.

V- CONCLUSIONES

- Después de evaluar las 374 muestras de estudio para las que se conocían datos de verdad y 1 729 muestras de trabajo de casos, determinamos que los umbrales inferiores a los publicados por Alderson, et al, están respaldados por estos datos utilizando los protocolos de laboratorio descritos anteriormente. Aplicamos varias opciones de umbral y determinamos que las muestras con al menos 200 pg de ADN masculino en F2 y al menos el 10% del ADN masculino total encontrado en F2 respaldaban una identificación positiva de espermia en la muestra.
- Si bien estos umbrales no permiten la detección de todas las muestras que contienen espermia, fueron útiles para indicar la presencia de espermia en 15 de las 65 muestras postcoitales que no se pudieron detectar utilizando ninguna de las tres pruebas serológicas disponibles en USACIL. La mayoría de esas 15 se recolectaron >24 horas después del coito, lo que indica que estos umbrales pueden beneficiar a los casos en los que los kits de agresión sexual se recolectan más de un día después de la presunta agresión.
- La utilización de umbrales de extracción diferencial representa un avance significativo en el campo de la genética forense. Sin embargo, es importante seguir investigando y desarrollando esta técnica para superar sus limitaciones y maximizar su potencial.

VI- BIBLIOGRAFIA

- V.W.Weedn, G.S.Rogers, B.E.Henry
Pruebas de ADN en el laboratorio forense
Laboratorio, Medicina, 29 (8) (1998), págs.484-489
- D.Taylor
Determinación probabilística de la fuente celular de ADN derivado de extracciones diferenciales en escenarios de agresión sexual
Forensic Sci. Int. Genet. 24 (2016), págs. 124-135
- P.Suttipitit, S.Wongwittayapanich
Detección de antígeno prostático específico y semenogelina en muestras de mujeres víctimas de violación
J. Piernia Forense, Medicina, 54(2018), págs.102-108
- G.Alderson ycol.
Inferir la presencia de espermatozoides en muestras forenses basándose en el fraccionamiento del ADN masculino tras la extracción diferencial

BIBLIOGRAFÍA

1. Ciencia Forense Internacional. El método modificado de extracción diferencial en dos pasos de ADN de espermatozoides y células epiteliales vaginales a partir de fluido vaginal mezclado con semen. National Library Of Medicine National Center for Biotechnology Information. 1995.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4560716/>
2. J Ciencia Forense. Técnicas alternativas de lisis de células espermáticas por amplificación directa para el procesamiento de muestras de agresión sexual. National Library of Medicine. 2022.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35285573/>
3. Evelyn Ridgley aDKO. Utilización de umbrales de extracción diferencial para deducir la existencia de espermatozoides en muestras de casos forenses. ELSEVIER, Forensic Science International: Reports. 2024.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665910724000148>
4. Biomicrofluídica. Separación de espermatozoides y células epiteliales basada en el efecto hidrodinámico para análisis forense. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information. 2015.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4560716/>
5. Revista Cubana de Física [Internet]. [consultado el 21 de septiembre de 2024]. Disponible en:
<http://www.revistacubanadefisica.org/RCFextradata/OldFiles/2011/vol.28-No.1/RCF-28-1-2011-60.pdf>
6. Westreicher G. Economipedia [Internet]. Cuartil -Qué es y Cómo Interpreta Datos; 2 de febrero de 2021 [consultado el 21 de septiembre de 2024]. Disponible en:
https://economipedia.com/definiciones/cuartil.html#google_vignette