

Estudio del ADN espermático en Genética Forense

DNA sperma study in genetic forensic

Fecha de Presentación: mayo de 2018
Fecha de Aceptación: septiembre de 2018

Lic. Engracia Berenice Barco Briones
Colegio Libre de Estudios Universitarios Campus León

12

Resumen

La Genética Forense surge como especialidad de la Genética para ayudar a resolver problemas de índole jurídico, como anteriormente se hizo mención, ningún individuo puede tener el mismo ADN, con excepción de los gemelos idénticos. Esos pequeños cambios en la estructura de la cadena biológica más importante del ser humano, son los que serán de gran relevancia y materia de estudio de la Genética Forense, la cual no sólo se basa en la identificación de personas con fines criminalísticos, también en los casos de personas desaparecidas, para pruebas de paternidad o bien para la identificación de las personas víctimas de un desastre natural.

Palabras Clave

ADN, cromosoma, genética forense, agente alquilante.

Abstract

The Forensic Genetics emerges as a specialty of Genetics to help solve problems of a legal nature, as previously mentioned, no individual can have the same DNA, with the exception of identical twins. These small changes in the structure of the most important biological chain of the human being, are those that will be of great relevance and subject matter of the Forensic Genetics, which is not only based on the identification of people with criminalistic aims, also in the cases of missing persons, for paternity tests or for the identification of the victims of a natural disaster.

Keywords

DNA, chromosome, forensic genetics, alkylating agent

INTRODUCCIÓN

Constantemente se han innovado diversas ciencias, una de ellas son las forenses, las cuáles han tenido un peso significativo al momento de resolver delitos, encontrar la verdad histórica de los hechos es el principal objetivo al momento de analizar un caso. A lo largo de la historia se han hecho descubrimientos en diversas materias que han servido como auxiliar en el proceso investigativo, la mayoría encaminadas a resolver el enigma del presunto autor.

Esta primera parte, no es un recorrido histórico sobre cómo a la par de este avance tecnológico, surge una herramienta que se posiciona como la más eficaz al momento de coordinar la identificación de personas por medio de la huella genética; el examen de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) principal coadyuvante en el sistema oral penal acusatorio en el cuál, se debe sustentar mediante elementos materiales probatorios y evidencia física la culpabilidad del presunto imputado para garantizar la certeza de quien se va a procesar.

Es la constancia del ADN, en comparación con otros materiales biológicos como son las proteínas y/o enzimas, que lo hace un método más exacto, puesto que sólo los gemelos idénticos llegan a tener el mismo ADN.

Los primeros trabajos realizados en materia de Genética corren a cargo del monje y botánico austriaco Gregor Mendel, quien a lo largo de su trabajo con guisantes pudo establecer proporciones y estadísticas de los rasgos heredados para determinar los que son recesivos y los que son dominantes, obteniendo así su título como padre de la Genética (Contijoch, 2007).

Durante la investigación forense, se debe tener en cuenta que el ADN encontrado en un lugar de intervención no siempre estará en las condiciones adecuadas. Es conocido que una vez fuera del organismo se encontrará sujeto a condiciones ambientales que alteren su condición natural que mantienen dentro del cuerpo, ahora bien, si el ambiente se torna extremo provocará la alteración de las propiedades físico-químicas del ADN; es decir, se degradará y esta degradación se tomará como media o severa dependiendo particularmente de las circunstancias en las que se encuentre la muestra. De las condiciones ambientales que provocan más cambios en el ADN son el tiempo, temperatura, luz, humedad y su posible interacción con algunas sustancias químicas.

Los protocolos del ADN forense han sido probados, optimizados y validados con el uso de muestras que han sido manipuladas intencionalmente para simular un ambiente hostil para la muestra y factores que puedan complicar su determinación. Los diferentes efectos se han categorizado usualmente en pruebas diagnóstico las cuales han sido ideadas con el mero propósito de detectar las ocurrencias posteriores. Este tipo de rastros dentro del análisis son elegidos en forma de análisis informativo para poder seguir un patrón e inteligentemente interpretar los resultados de la

prueba (Patrón, 2015).

El ADN con aplicación forense, en las situaciones que describimos anteriormente, se encuentra en sangre, cabello, saliva, uñas, células epiteliales, restos óseos, dientes o semen, este último será el de relevancia de esta investigación.

La investigación estará centrada en el ADN obtenido de células espermáticas, la recolección de la muestra representa un aspecto importante para que las pruebas presuntivas y confirmativas arrojen un resultado certero, dado que este indicio biológico, es comúnmente encontrado en casos de delitos sexuales, de ahí la relevancia del informe médico realizado a la víctima.

Estrategias para estudiar la fragmentación del ADN espermático

Existen diferentes estrategias para estudiar la fragmentación del ADN espermático. Por un lado, se encuentran las metodologías encaminadas a marcar las roturas, tanto de cadena sencilla como de cadena doble (totales) que se registran de forma natural o fortuita en la molécula de ADN; dentro de este grupo se incluyen, por ejemplo, el ensayo de TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling). El ensayo de TUNEL permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados a los extremos que quedan libres a causa de las roturas en el ADN, sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza in situ mediante la acción de una transferasa terminal, esta enzima incorpora deoxiuridina modificada con biotina o digoxigenina en el extremo 3'-OH de la cadena afectada, el nucleótido incorporado está directamente marcado con un fluorocromo. Teóricamente, la señal de marcado obtenida por cada espermatozoide se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de ADN. Esta técnica ha tenido muy buena aceptación dado que es versátil, está comercialmente disponible y los resultados pueden ser interpretados fácilmente. La determinación se realiza con fluorescencia y la marca observada es muy clara a la hora de obtener un valor numérico (VN < 20%). Junto a este ensayo, la técnica incorpora la marcación de caspasa 3 activa. Las caspasas son los principales transductores y efectores de las señales de apoptosis que dan lugar a la muerte celular programada. Hasta la fecha se han identificado más de 14 tipos de caspasas que se han dividido en dos familias. Las caspasas -2,-3,6,-7,-8,-9 y -10 median señales de apoptosis y las caspasas -1,-4,-5,-11 y -12 regulan citoquinas durante procesos inflamatorios. Aunque la mayoría de ellas se sitúan en el citoplasma, algunos miembros pueden ser encontrados en asociación con las mitocondrias (-2,-3,-9) y en el aparato de Golgi (-12). La caspasa 3 es la más importante de las efectoras ya que su activación marca un punto de no retorno en la señalización de la apoptosis. La presencia de caspasa 3 activa en muestras de semen puede ser medida por epifluorescencia y su presencia está relacionada con

altos niveles de inmadurez espermática (especialmente en muestras de pacientes infértiles), disrupción del potencial de membrana mitocondrial (especialmente presente en las muestras descongeladas) y bajos niveles de penetración ovocitaria y descondensación del núcleo espermático (Torres & Rawe, 2010).

Por otro lado, una segunda estrategia de estudio de la fragmentación se basa en medir la distinta capacidad de la cromatina y en particular del ADN para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Aquí se pueden nombrar técnicas tales como el SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), el ensayo del Cometa bajo condiciones desnaturalizantes y el SCD (Sperm Chromatin Dispersion). En el estudio de SCSA o Sperm Chromatin Structure Assay, desarrollado por Evenson & col, se desnaturaliza la molécula de ADN mediante una solución ácida o mediante un tratamiento con calor, y una vez desnaturalizada se tiñe con naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse entre las dos cadenas de ADN como un monómero y al ser excitado emite una longitud de onda de 530nm y se visualiza de color verde, mientras que al intercalarse en el ADN de cadena sencilla (desnaturalizado) emite una longitud de onda de 640nm (color rojo). Las células se separan por citometría de flujo. El ADN fragmentado es más susceptible de ser desnaturalizado y, por tanto, se visualizará en color rojo (Torres & Rawe, 2010).

El ensayo de cometa o electroforesis en gel de células individuales es un método sensible, rápido y relativamente de bajo costo para cuantificar daño en el ADN de células individuales. Puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de simple cadena del ADN. En esta técnica las células son embebidas en un gel de agarosa en un portaobjetos, sometidas a lisis mediante un agente reductor de grupos sulfhidrilo de las protaminas y luego corridas por electroforesis durante un corto tiempo. Luego el microgel es teñido con sustancias fluorescentes. Las células con mayor daño del ADN muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo, generando una imagen similar a la cola de un cometa. Los espermatozoides que no presentan fragmentación no generan esta imagen. La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de poder detectar fragmentación de simple o doble cadena del ADN espermático (Pääbo, 1989).

El ADN del espermatozoide se encuentra unas seis veces más compactado que el del cromosoma mitótico. Este ADN se encuentra organizado en bucles que se compactan por acción de las protaminas intercaladas, las que estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. La técnica de SCD o Sperm Chromatin Dispersion consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina mediante la ruptura de los puentes disulfuro en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen. Este efecto se consigue mediante un tratamiento ácido se-

guido de una desproteínización, donde los bucles de ADN se relajan constituyendo grandes halos alrededor de la estructura nuclear central. Por el contrario, los espermatozoides con fragmentación no liberan bucles de ADN y no generan el halo de dispersión de la cromatina o estos son de muy reducido tamaño. Simplemente valorando el tamaño de los halos de dispersión mediante microscopía tanto de campo claro como de fluorescencia es posible reconocer la presencia de fragmentación de ADN en los espermatozoides humanos. Los patrones a observar son los siguientes: las cabezas de espermatozoides donde se observan halos grandes o medianos no presentarían daño en el ADN espermático, mientras que aquellos con halos pequeños o sin ellos sugieren un daño en el ADN. Dentro de este grupo se encuentran también aquellos espermatozoides que presentan el núcleo degradado (Torres & Rawe, 2010).

El conocimiento más detallado de las regiones del ADN ha permitido utilizarlo para diferenciar a un individuo o determinar sus relaciones biológicas de parentesco. Retomando el trabajo realizado por Alec Jeffreys en 1985 teniendo en cuenta que él fue el primero en realizar estudios, obteniendo un patrón de bandas parecido a un código de barras que denominó huella digital del ADN o huella genética. Los marcadores moleculares de elección para estas pruebas son las regiones con repeticiones tándem de número variable (VNTR) y las repeticiones cortas en tándem (STR), los cuales poseen unidades de repetición de 30 pb en promedio, y de 2 a 5 pb, respectivamente (Rudin, et. Al., 2002).

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos, es necesario previamente aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares. La extracción de ADN es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de los ácidos nucleicos. Durante este proceso existen gran cantidad de sustancias que interfieren provenientes tanto de los propios reactivos de la extracción como de los soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas de interés criminalístico. Es conveniente obtener una buena cantidad de ADN cuando la muestra lo permite y que este se encuentre lo más limpio y puro posible, libre de contaminantes como proteínas básicas, ARN, carbohidratos, etc., que pueden bloquear la acción del tratamiento al que será sometido a dicho ADN. Por ejemplo, las proteínas básicas pueden inhibir la entrada de ADN en el gel de electroforesis (Solla, 2002).

Los tipos de extracción para muestras forenses en buen estado más habitualmente utilizadas por los laboratorios son la extracción orgánica y la no orgánica. El criterio de elección de uno u otro método de extracción no depende sólo del rendimiento en cuanto a cantidad de ADN, si no, de su éxito en la reacción de PCR (C.T. Comey, 1994).

Extracción orgánica

La extracción de ácidos nucleicos sobre muestras biológicas recientes o en condiciones óptimas (como por ejemplo la sangre líquida) sigue un protocolo estándar (S. Sambrook, 1989), que resulta bastante alterado cuando la muestra está muy deteriorada. El procedimiento más usual se conoce como “fenol-clorofomo” y tiene fundamentalmente tres etapas:

a) La digestión de las proteínas de la muestra con una enzima proteolítica acompañada de un detergente iónico (como SDS) para solubilizar componentes celulares y cloruro sódico. La enzima que habitualmente se usa es la proteinasa K, pues se inactiva fácilmente por calor para evi-

retiene ácidos nucleicos. Con cada lavado, se retiran proteínas provenientes de la lisis con proteinasa K, ya que estas disminuyen la pureza del ADN.

c) La precipitación del ADN con etanol en presencia de sales (por ejemplo, Acetato Sódico) y a bajas temperaturas. Mediante centrifugación, el ADN precipitado formará un sedimento en el fondo del tubo; se debe retirar todo el sobrenadante y se deja secar el sedimento para que se evapore el etanol y finalmente se suspende una vez más en el volumen que deseado de agua o del tampón que resulte más útil con la finalidad de tenerlo en disolución listo para su estudio. Con este método se logran retirar las proteínas



tar que interfiera en la reacción de amplificación. La digestión es un paso fundamental del proceso, pues es necesaria la lisis de las proteínas para la extracción de ADN. En este punto pueden interferir ciertas sustancias que inhiben esta lisis y no permiten el acceso a la molécula genética. Otro problema de este paso es que el SDS es un fuerte inhibidor de la enzima Taq polimerasa que se utiliza durante la PCR, por lo que será necesario realizar un paso de purificación para retirarlo (Higuchi, 1989). El lisado resultante, además de ADN contiene muchas otras moléculas que deben ser eliminadas en los tratamientos siguientes.

b) La fenolización que no es más que el ulterior lavado con una dilución habitualmente de fenol-clorofomol-alcohol isoamílico (24:24:1). Dicha dilución en su fase fenólica, retiene las proteínas, mientras que en su fase acuosa

y otros componentes celulares separándolos de los ácidos nucleicos. El ADN así obtenido es de doble hebra.

Extracción no orgánica

La extracción no orgánica se realiza con agentes quelantes como la resina Chelex®. Dicha resina está formada por copolímeros de estirenodivinilbenceno que contienen iones iminodiacetato que actúan como grupos quelantes. El procedimiento básico consiste en la maceración y posterior hervido de la muestra en una solución de Chelex® al 5% para finalmente añadir el sobrenadante directamente a la reacción de PCR.

Los agentes quelantes son capaces de capturar iones libres en una dilución, lo cual es una ventaja pues dichos

iones inhiben la actividad de las enzimas que interviene en la síntesis artificial de nuevo ADN mediante la técnica de PCR. Además, impiden la rotura o degradación del ADN pues quelan los iones metálicos que catalizan la rotura de la hebra de ADN sometida a elevadas temperaturas en condiciones de baja fuerza iónica (J. Singer-Sam, 1989) (P.S. Walsh, 1991), de manera que después sea posible estudiar la molécula en condiciones óptimas. Este tipo de extracción produce ADN de hebra sencilla, por lo que se puede usar para análisis del tipo PCR, pero no para otros análisis como RFLPs.

Las ventajas que presenta el último método descrito con respecto a los métodos orgánicos son: la rapidez de la técnica, su simplicidad, no conlleva el uso de reactivos tóxicos y, cuando se trata de un gran número de muestras, su bajo precio también puede ser un factor a tener en cuenta. Además, este tipo de resinas se pueden usar durante la extracción de ADN (P.S. Walsh, 1991), o como un paso de purificación después de la extracción orgánica.

Purificación

El tratamiento de muestras forenses como pequeñas manchas de sangre, saliva o esperma, resulta algo más complicado en cuanto a la extracción de ADN porque, en última instancia, se obtienen cantidades de dicha molécula muy reducidas. Uno de los principales problemas en las muestras forenses críticas es la presencia de sustancias distintas a los ácidos nucleicos que se co-extraen durante el procesamiento de las muestras. A menudo es difícil separar la muestra de su soporte sin que algunos componentes de este último pasen al extracto. Estas sustancias pueden interferir en los análisis posteriores por ejemplo inhibiendo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Por ello es conveniente realizar una purificación de los extractos de ADN una vez obtenidos. Con los filtros especiales del tipo Centricon y Microcon (Amicon, USA) se logra esta purificación obteniéndose una dilución final más pura. Además, se logra concentrar el ADN extraído, hecho muy interesante en muestras tan críticas como las nuestras. Estos filtros poseen una membrana hidrofílica con muy baja capacidad de adsorción, lo cual permite el paso a través de ella de gran parte del solvente del extracto y de todos los solutos de bajo peso molecular, reteniendo los solutos más pesados (ADN). Con ello se consigue concentrar la solución de ADN hasta 80 veces, con una pérdida mínima de este.

Los ácidos nucleicos de muestras críticas se encuentran normalmente muy fragmentados y el rendimiento de su análisis queda reducido a unas 1000 veces menos que una muestra en buenas condiciones (Rogan & Salvo, 1991). La temperatura, la humedad, el pH, los agentes oxidantes, la radiación y la presión mecánica son algunos de los facto-

res más importantes que influyen sobre el ADN (Scholer G, 1960). Su impacto sobre el ADN todavía no se conoce en detalle, pero se sabe que bajo ciertas condiciones el ADN se fragmenta (Pääbo, 1989). Tras la muerte se ponen en marcha principalmente dos mecanismos (Bär, Kratzer, Mächler, & Schmid, 1988).

La autólisis, que es una autodigestión mediante enzimas liberadas por los lisosomas celulares.

La putrefacción, que es la descomposición anaeróbica de proteínas mediante bacterias, normalmente acompañada de la producción de gas.

La pérdida de la regulación enzimática y la acidosis láctica de la autólisis aumentan la actividad de algunas enzimas como las hidrolasas (Bradley, 1938). En este grupo de enzimas se incluyen las nucleasas presentes en la propia muestra antes de que esta se seque y a su vez se pueden dividir en dos subgrupos:

I. Endonucleasas que descomponen el ADN cortándolo en pequeños fragmentos.

II. Exonucleasas que despegan nucleótidos desde los extremos de las moléculas de ADN haciéndolas cada vez más cortas (Lewin B, 1987).

El Calcio y el Magnesio pueden activar las nucleasas que atacan al ADN en la cromatina (Burgoyne & Hewish, 1978). El tipo de daño más común causado por las nucleasas es el ataque en las zonas del ADN más expuestas, como las cortas regiones entre nucleosomas adyacentes que no se encuentran protegidas por las histonas. Este tipo de degradación es característico de las nucleasas de mamíferos dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} y también de algunas nucleasas bacterianas (Noll M, 1974).

Agua como factor de descomposición

La humedad del aire también influye en el grado de autólisis (Machie, 1929) y por tanto en la degradación del ADN. Han realizado estudios sobre la degradación del ADN extraído de restos óseos. En sus análisis concluían que las muestras sometidas a bajas condiciones de humedad se degradaban más lentamente que las sometidas a elevada humedad.

Por tanto, el agua es uno de los compuestos que más afectan a la degradación del ADN por intervenir en los mecanismos de descomposición como reactante o como medio (Machie, 1929). En ausencia de agua, el crecimiento bacteriano, la degradación enzimática, la hidrólisis espontánea y otras formas de daño químico, se reducen drásticamente.

En algunas muestras forenses es posible encontrar contaminantes microbianos (Por ejemplo: muestras recolectadas de la boca o de la vagina). Otras veces aparece



este tipo de contaminación cuando la muestra permanece en condiciones de humedad durante un período de tiempo considerable. La contaminación microbiana tiene dos consecuencias para el análisis ADN:

- El aporte de nucleasas exógenas a la muestra que producen degradación.
- El aporte de ADN exógeno de tal manera que a veces la muestra contiene más cantidad de ADN microbiano que de su propio ADN original.

En muestras de sangre es el hierro presente en la hemoglobina la causa de la degradación del ADN pues cataliza la ruptura de las uniones fosfodiéster entre los azúcares adyacentes. Además, la hemoglobina inhibe la reacción en cadena de la polimerasa, por eso es tan importante eliminarla en un proceso anterior a la extracción a partir de sangre mediante sucesivos lavados de la muestra en un tampón.

Para evaluar el estado de degradación que presenta una muestra de ADN se recurre a la electroforesis submarina en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Si al leer el gel bajo la luz U.V. aparece una banda nítida, significa que el ADN está en excelentes condiciones, se trata de ADN de alto peso molecular. Si aparece una "cola" a lo largo del carril de migración, el ADN estará degradado, y serán fragmentos que migran a diferente altura por ser de diferente tamaño.

El uso de ADN degradado como molde puede dar resultados negativos en una reacción PCR si no existe ninguna copia completa en la muestra del fragmento a amplificar. Este problema puede solucionarse únicamente probando experimentalmente series de cebadores para cada muestra.

Lesiones en el ADN

El ADN es objeto de lesiones mediante agentes físicos y químicos en el medio ambiente y mediante radicales libres o agentes alquilantes en el metabolismo. El ADN también puede sufrir errores en el transcurso de su replicación y durante otros procesos metabólicos. Algunas de las modificaciones químicas pueden ser consecuencia de la oxidación de las desoxirribosas o de las bases. Estos procesos afectan a la integridad y al rendimiento de las secuencias de ADN que han de ser analizadas. Las lesiones más comunes en el ADN son:

1. Pérdida de una base: Los ácidos y el calor eliminan purinas en el ADN (Pääbo, 1989); a pH y temperaturas fisiológicas se pierden alrededor de 2000-10.000 purinas y varios cientos de pirimidinas por día. Gracias a la continua reparación del ADN, los organismos vivos son capaces de mantener su material genético, pero después de la muerte dicha reparación del ADN cesa y los procesos destructivos continúan. Ciertas alteraciones desestabilizan a las bases llegando a su eliminación.

2. Alteración de una base (o un nucleótido): las radiaciones ionizantes y los agentes electrofílicos (incluidos los agentes alquilantes) modifican las bases y azúcares. Mutágenos alquilantes como la nitrosamina añaden un grupo metilo o etilo a la base de un nucleótido. Esto lleva a una alteración de los puentes de hidrógeno de manera que el nucleótido alterado puede aparearse con otro nucleótido erróneo (sustitución de bases). Un sitio especialmente sensible a este tipo de daño es el carbono nº 6 de la Guanina. Se alquila rápidamente aceptando un grupo metilo. El producto resultante, O6-metilguanina, puede formar sólo dos puentes de hidrógeno y así aparearse con timina en vez de hacerlo con citosina. Durante la próxima replicación, la citosina estará reemplazada por una timina en esa posición (transición).

3. Bucle debido a delección o inserción: los agentes intercalantes (ej.: acridinas) insertados entre los anillos planos de las bases, causan la omisión o adición de nucleótidos durante la replicación.

Pirimidinas ligadas: La radiación U.V. (254 nanómetros) produce dímeros de ciclobutilo entre pirimidinas adyacentes, concretamente dímeros de timina, citosinas vecinas o una timina y una citosina. Esto ocasiona una ruptura de los puentes de hidrógeno con las bases opuestas complementarias. Estos y otros cambios estructurales hacen que se incorpore una base errónea en la nueva hebra de ADN durante la siguiente replicación. No obstante, la célula viva dispone de mecanismos de reparación para este daño. Por citar uno de ellos la célula es capaz de escindir las dos timinas unidas (dímeros) mediante una nucleasa y la reparación de las bases correctas mediante polimerasa seguida de ligasa. Es importante saber que este tipo de daño en el ADN produce un decrecimiento del producto amplificado, pero no produce falsos positivos, ya que el poco ADN que pueda permanecer intacto es el que sirve preferencialmente como molde en la amplificación.

5. Rotura de hebras: Mediante el ataque directo a un residuo de azúcar o como consecuencia de alteraciones en las bases, las uniones fosfodiéster se rompen (simples o dobles) tras la radiación ionizante (Henner WD, 1982) o la acción de ciertos agentes químicos. Los radicales libres del tipo hidroxilo hidrolizan las desoxirribosas y producen la rotura de hebras. Estas alteraciones son irreversibles y destruyen la capacidad de la hebra rota de actuar como "primer" para el ADN polimerasa ya que los extremos 3' y 5' se encuentran modificados.

6. Fragmentos de desoxirribosa: La ruptura de desoxirribosa mediante agentes generadores de radicales libres (bleomicina y radiación ionizante) dejan las hebras rotas terminadas con azúcares 3'.

7. Cruzamiento de hebras: los agentes bifuncionales alquilantes pueden formar uniones covalentes entre las dos hebras de ADN impidiendo su separación (mitomicina).

8. Radicales de oxígeno: Es una de las mayores fuentes de lesiones en el ADN. El oxígeno tiene un efec-

to adverso en las células eucarióticas. Las hebras de ADN pueden romperse como resultado del daño oxidativo causado por los radicales de oxígeno generados en la mitocondria y producidos en el ambiente circundante por los microbios (Gibson, 1984). La presencia de algunos metales como el hierro o el zinc también contribuyen al daño facilitando el ataque, ya que el efecto que producen los radicales de oxígeno está mediado por iones metálicos (Butzow J., 1975). Por ello, los quelantes, basureros de radicales de oxígenos, y los niveles incrementados de ciertas enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa) reducen la toxicidad del oxígeno in vivo e in vitro.

9. Desnaturalización de la doble hebra de ADN: las condiciones alcalinas pueden desnaturalizar el ADN de doble hebra y así eliminar la estabilidad que la molécula tiene por las uniones del tipo puentes de hidrógeno entre ambas hebras. Las bases nitrogenadas expuestas, además, pueden ser más susceptibles a modificaciones químicas y degradación; la timina puede convertirse en timinglicol y la citosina en 5hidroxicitosina y ácido isodialúrico (Teoule R., 1978). La alteración de la estructura de los anillos en las bases puede modificar las interacciones de bases adyacentes y así desestabilizar la doble hebra, aunque no cambie la especificidad del apareamiento entre bases (Rogan P, 1990).

La consecuencia de la modificación de nucleótidos para los análisis posteriores depende de la naturaleza y la extensión de la modificación. Los test de la formación de dímeros de pirimidinas, por ejemplo, indican que el daño debe ser cercano a la saturación para causar efecto (Buoncristiani M., 1990). Los entrecruzamientos de ADN reducen la eficacia de la extracción y, en casos extremos, hacen al ADN inextraíble.

En resumen, la modificación de los ADN molde pueden afectar de dos maneras los análisis vía PCR: o bien introduciendo bases incorrectas en la secuencia resultante, o bien bloqueando el ADN polimerasa. Todo ello limita la longitud de las secuencias que podrían amplificarse de manera exitosa (Pääbo, 1989).

CONCLUSIONES

La aplicación de la Genética Forense en el estudio de delitos contra la libertad sexual, representa una fuente primordial para la obtención de datos de gran valor sobre la individualidad de ese vestigio y el espermatozoide representa un elemento idóneo para el análisis de ADN.

Para poder llegar al objetivo principal de las ciencias forenses, que es demostrar la verdad histórica de los hechos, primeramente, se debe analizar en el laboratorio la muestra, lo que permitirá la especificidad de esta, posterior se debe hacer la comparación de los resultados con los que se obtendrán del inculpado o los recopilados en la víctima. Es indispensable también llevar a cabo la valoración probabilística de la prueba en el caso de coincidencia de patrones para finalmente, emitir el informe legal correspondiente, o

bien, comunicar los resultados en el proceso de juicio oral.

En materia forense, la utilidad de tener este registro, será el de determinar el grado de aportación que pueda llegar a tener una muestra dependiendo del tiempo que ha pasado desde su eyaculación.

La investigación realizada, en materia de Criminalística de Campo, no proporciona ningún dato teórico sobre el tiempo que puede pasar para que el ADN presente en el semen se degrade y que impida la extracción del mismo. Por ello es que esta investigación dejará vestigio del decremento de la viabilidad de una mácula seminal, marcando así el tiempo máximo de aprovechamiento para su estudio en laboratorio y la búsqueda de ADN en este indicio biológico, con el objetivo de una perfilación genética.

Es indispensable recordar que, desde un plano institucional, la justicia no debería cerrar un caso si existen evidencias de las cuales pueden obtenerse los perfiles genéticos puesto que en algún momento dado puede aparecer el sujeto con el perfil de ADN del sospechoso. La prueba de ADN tiene el alcance de confirmar que es culpable o bien inocente y eximirlo del delito.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, J. A. (2007). *Genética Forense. La ciencia al servicio de la Justicia*. Ciudad Universitaria, D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Ambroz, M. F. (1999). *Hematología Forense*. México: Porrúa.

Anónimo. (Junio de 2017). *Doctissimo*. Obtenido de Doctissimo, diccionario médico. Recuperado de: <http://www.doctissimo.com/mx/salud/diccionario-medico/alquilante>

Bär, W., Kratzer, A., Mächler, M., & Schmid, W. (1988). *Post-mortem stability of DNA*. *Forensic Science*.

Bernath, V. (2012). *ADN, el detector de mentiras*. *Química Viva*, 41-53.

Bradley, H. (1938). *Autolysis and atrophy*. *Physiol. Rev.*

Buoncristiani M., v. B. (1990). *Effects of U.V. damage on DNA amplification by the polymerase chain reaction*. Berlin: Springer-Verlag.

Burgoyne, B., & Hewish, D. (1978). *The regular substructure of mammalian nuclei and nuclear Ca-Mg endonuclease (4ta ed.)*. *The cell nucleus*.

Butzow J., E. G. (1975). *Different susceptibility of DNA and RNA to cleavage by metal ions*. *Nature*.

C.T. Comey, B. K. (1994). *DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis*. *Journal of Forensic Sciences*, 39(5), 1254-1269.

Caro, P. M., Aversa, c. S., Cerolini, R., & Doro, G. (2007). *Manual de química forense*. Buenos Aires: Ediciones La Rocca.

Compostela, I. d. (Junio de 2013). *ADN: La genética forense y sus aplicaciones en investigación criminal*. Obtenido de http://sgfm.elcorteingles.es/SGFM/FRA/recursos/doc/2013/PONENCIAS/Junio/1559347945_1062013102130.pdf

- Contijoch, M. P. (2007). *Introducción a la genética: el mensaje hereditario*. México: Trillas.
- Electra González, V. M. (2004). Características de los abusadores sexuales. *Rev Sogia*, 6-14.
- Española, R. A. (2001). *Diccionario de la lengua española*. Madrid, España.: 22a. edición.
- Gibson, D. (1984). *Microbial degradation of organic compounds*. New York: Marcel Dekker.
- Henner WD, G. S. (1982). Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.*
- Higuchi, R. (1989). Simple and rapid preparation of sampler for PCR. En E. HA, *PCR technology. Principles and applications for DNA technology*. (págs. 31-43). Nueva York: Stockton Press.
- I., T., & J., E. (1990). Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone. *Journal of Archeological Science*, 679-689.
- J. Singer-Sam, R. T. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, 3, 11.
- Lewin B. (1987). *Genes II*. Wiley: New York, NY.
- Lisker, R., Dehesa, A. Z., & González, P. G. (2013). *Introducción a la genética humana*. México: El manual moderno.
- Machie, F. (1929). The microscopically changes occurring in organs after death. *Indian Journal of Medical Research*.
- Niño, R. S. (1990). Tarjeta genética de identificación personal. En *Medicina Legal Criminalística y Toxicología para abogados* (págs. 521-522). Bogotá, Colombia.: Temis.
- Noll M. (1974). Subunit structure of chromatin. *Nature*.
- Observatorio Nacional Ciudadano Seguridad, J. y. (2017). *Reporte sobre Delitos de Alto Impacto*. Marzo 2017. México, D.F.: Observatorio Nacional Ciudadano Seguridad, Justicia y Legalidad.
- P.S. Walsh, D. M. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*.
- Pääbo, S. (1989). *Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification*. USA: Proc Natl Acad. Sci.
- Patrón, G. S. (Abril de 2015). Análisis de la degradación por factores ambientales del ADN en muestras sanguíneas en la obtención de un marcador genético con aplicación forense. *TEMA'S(30)*, 22-45.
- Rogan P, S. J. (1990). Use of universal PCR primers amplify 28S ribosomal DNA from taxonomically diverse organisms. (Vol. Vol. 2). College Park, Md: University of Maryland.: *Proceedings of the 4th International Congress of Systematic and Evolutionary Biology*.
- Rogan, P., & Salvo, J. (1991). Study of nucleic acids isolated from ancient remains. En *Year book of Physical Anthropology* (págs. 195-214).
- Rudin, N., & Inman, K. (2002). *An introduction to Forensic DNA Analysis*. EUA: CRC Press.
- S. Sambrook, E. F. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Scholer G, W. J. (1960). Mechanisms of the radiation-induced degradation of the nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 379.
- Seminario, T. M., & Camoretti, J. H. (s.f.). *Identificación Genética*. Lima, Perú: Peritos PNP.
- Solla, L. P. (2002). *Estudio de los polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Sosa, J. M. (2012). *Criminalística I*. México: Limusa.
- Teoule R., C. J. (1978). *Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances-final products*. Alemania: Effects of ionizing radiation on DNA-Physical, Chemical and Biological aspects.
- Torres, M. A., & Rawe, V. (2010). Fragmentación del ADN espermático: su dinámica en el tiempo y la importancia de ir más allá de lo evidente. *Reproducción*, 185-191.