

TRABAJO INTEGRADOR FINAL



“Efectos del Reactivo Luminol frente a la obtención de Perfiles Genéticos”

Yesica D. MARQUEZ.

INSTITUTO UNIVERSITARIO de GENDARMERIA NACIONAL ARGENTINA

LICENCIATURA EN CRIMINALÍSTICA

Tutor: Dra. Romina S. COLOCCINI, Licencia en Genética.

Año 2021

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

RESUMEN

El trabajo integrador final fue realizado a fin de evaluar la influencia del reactivo Luminol en la obtención de perfiles genéticos analizables a partir de muestras de tejido hemático extraídas de diversos soportes tales como tela, cerámica, metal y madera, a los cuales previamente se les aplicó sangre humana y posteriormente fueron lavados con blanqueadores. Todo ello, con el objetivo de evaluar la incidencia del reactivo en la obtención de perfiles genéticos, valorando la calidad del mismo.

El reactivo Luminol es uno de los métodos más empleados a nivel mundial en las escenas del crimen de carácter violento, tales como: homicidio, delitos contra la integridad sexual, suicidios, etc. Uno de los primeros indicios a tratar en la inspección son las manchas o rastros latentes (muestra no visible al ojo humano), de sangre humana, lo cual es de radical importancia para lograr el esclarecimiento del hecho.

La aplicación del Luminol produce quimioluminiscencia, permitiendo detectar presuntas trazas de tejido hemático, siendo este último una muy buena fuente de obtención de Ácido Desoxirribonucleico (ADN). Es por ello, que los patrones genéticos obtenidos a partir del tejido hemático son muy útiles a la hora de determinar la coincidencia entre una muestra tomada del lugar del hecho (dubitada) y la muestra perteneciente al damnificado y/o imputado (indubitada).

Existen discrepancias en ciertas bibliografías en cuanto al efecto de productos químicos sobre la estabilidad de las muestras biológicas, como así también los efectos adversos o interferencias en exámenes posteriores, tendientes a evidenciar trazas de origen hemático, siendo uno de ellos la tipificación de ADN.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelaron que los reactivos de Luminol ensayados bajo las condiciones evaluadas no destruyen al ADN, ya que fue posible obtener perfiles genéticos que permiten arribar a la correcta identificación del individuo. Sin embargo, en el 31,25 % de las muestras analizadas, no se logró la recuperación de un perfil genético debido a que presentaron bajas concentraciones de ADN, por lo tanto, fueron excluidas del trabajo. Concluyendo a que el bajo

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

rendimiento referente a la concentración de ADN es atribuido a los lavados y/o la combinación de éstos con los reactivos luminol.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Planteamiento de problema.....	1
Justificación.....	1
Objetivo general.	1
Objetivos específicos.	2
II. DESARROLLO.	3
Estado del arte.	3
Investigación I.....	3
Investigación II.....	4
Investigación III.....	4
Investigación IV.....	5
Investigación V.....	6
Investigación VI.....	7
Investigación VII.....	8
Investigación VIII.....	9
Marco teórico.....	9
Sangre.....	9
Propiedades físicas.....	10
Sustancia intracelular de la sangre.	10
Elementos figurados o porción solida de la sangre.....	11
Ácido desoxirribonucleico.....	12
Importancia para las ciencias forenses.	13
Muestras de ADN relevantes para las ciencias forenses.....	13
Evolución de las técnicas de análisis de ADN.	14
Luminol.....	16
Historia del Luminol.....	16
¿Qué variantes existen del reactivo?	17
¿Qué es el Luminol y para que se utiliza?	17
Importancia del Luminol en Criminalística.....	18
Metodología.....	19
Métodos.	19
Obtención de la muestra de sangre humana.	20
Preparación de muestras.....	20

Lavados / limpieza de muestras.....	23
Preparación de reactivos.	25
Aplicación de reactivos.	26
Levantamiento de muestras.....	28
Técnicas de biología molecular utilizadas para la obtención de los perfiles genéticos.....	32
Extracción de ADN celular.	32
Cuantificación de ADN.	34
Amplificación de ADN.	43
Amplificación de ADN autosómico.	43
Amplificación de ADN de Cromosoma Y.....	45
Obtención de perfiles genéticos.....	46
Obtención de perfil genético STRs autosómicos.	47
Obtención de perfil genético STRs DE Cromosoma Y.....	47
Procesamiento y análisis de datos.....	48
Presentación de resultados y discusión.	50
Síntesis de resultados.....	58
Discusión de resultados presentados.	59
III. CONCLUSIONES.	65
IV. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.	67
V. ANEXOS.	69
Anexo I – materiales y métodos.	69
Anexo II- preparación de reactivos.....	73

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

I. INTRODUCCIÓN.

Planteamiento de problema.

Debido a que el reactivo Luminol es utilizado para la búsqueda de rastros de sangre latentes en el lugar del hecho o sobre prendas de vestir, es de suma importancia estudiar el efecto de la aplicación de este reactivo en la integridad de las muestras de tejidos de origen hemático. Es por ello que el principal interrogante de esta investigación se orientó a dilucidar el posible efecto de este reactivo sobre las muestras extraídas de diferentes superficies (tela, madera, cerámica y metal), para determinar si produce destrucción o algún tipo de deterioro de las mismas y si a partir de las muestras que hayan tomado contacto con este reactivo es posible realizar la tipificación de ADN para obtener un perfil genético que permita identificar a la persona que produjo dicho rastro biológico.

Justificación.

Este trabajo aporta al conocimiento de la Criminalística moderna respecto de las consecuencias que conlleva la utilización del reactivo luminol en muestras que han sido lavadas, destacando que este método es una técnica presuntiva, la cual nos revela la posible naturaleza de la mancha no categóricamente, es decir, solo son útiles para descartar, pero no para concluir y son necesarias pruebas con mayor especificidad para poder arribar a un resultado categórico, como lo es la tipificación de ADN.

Así mismo, para llevar adelante el TIF, se contó con gran cantidad de material bibliográfico que sustenta la tarea investigativa realizada basándose en técnicas y procedimientos científicos.

Objetivo general.

Evaluar la influencia del reactivo Luminol en la obtención de perfiles genéticos analizables a partir de muestras de tejido hemático extraídas de diversos soportes tales como tela, cerámica, metal y madera.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Objetivos específicos.

Establecer la influencia de los soportes utilizados (tela, cerámica, metal y madera) que fueron sometidos a los reactivos de luminol, frente en la obtención de perfiles genéticos.

Determinar el efecto de los lavados realizados y del reactivo Luminol aplicado, en base a la obtención de perfiles genéticos.

Comparar los reactivos de Luminol, como así también de los lavados utilizados, a fin de evaluar la opción más viable, en virtud de los perfiles genéticos obtenidos

Evaluar la cantidad de ADN extraído de las muestras que previamente fueron lavadas y que luego se les aplico reactivo luminol.

Evaluar la calidad del perfil genético obtenido (cantidad de alelos detectados) como medida del efecto del reactivo Luminol sobre las muestras analizadas.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

II. DESARROLLO.

Estado del arte.

Investigación I.

Mejora de las manchas de sangre en la ropa lavada con reactivos Luminol y Leucocristal violeta

Tomas W. Adair y Rebecca L. Shaw (2005), llevaron a cabo una investigación para identificar manchas de sangre latentes (no visibles) en prendas de vestir que habrían sido lavadas con agentes de limpieza, con la aplicación del reactivo luminol, violeta de genciana y fenolftaleína. Estos son reactivos de uso común para identificar posibles manchas de sangre no visibles en evidencia y/o en escenas del crimen.

En síntesis, la investigación que realizaron se basó en sembrar muestra de sangre de referencia con diferentes patrones en diez camisetas de algodón, las cuales fueron sometidas a una serie de lavados en lavadora con el agregado de un agente limpiador (detergente), y posteriormente secado automático por una hora. Esta metodología fue diferente en todos los casos, es decir que algunas camisetas solo fueron lavadas y otras lavadas y secadas. Una vez que finalizaron todo lo expuesto, procedieron a cortar porciones de las prendas para luego aplicar el reactivo luminol en la mitad de las prendas y el reactivo violeta de genciana en la mitad restante, mientras que la fenolftaleína se aplicó en todas las prendas posteriormente a la aplicación de los reactivos de luminol y violeta de genciana.

Como resultado se obtuvo que el uso de un reactivo químico independientemente del reactivo utilizado puede ser el único método aceptable para identificar manchas de sangre en prendas de vestir que hayan sido lavadas y secadas, es por ello que los investigadores recomiendan el uso del luminol como un reactivo eficaz para visualizar manchas de sangre latentes en ropa lavada; mientras que el violeta de genciana no arrojó resultados aceptables en este estudio. Por otra parte, con la aplicación de la fenolftaleína se obtuvieron resultados positivos en ropa lavada, incluso después de la aplicación de estos dos reactivos químicos.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Investigación II.

Evidencia de rastros de sangre en textiles lavados.

Edler, C., Gehl A., Kohwagner J., Walther M., Krebs O y Agustin C. (2017), realizaron una investigación cuyo objeto era identificar las posibilidades de detectar sangre humana y luego realizar tipificación de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) en diferentes prendas de vestir que habrían sido lavadas y posteriormente secadas.

En resumen, para la investigación utilizaron diferentes prendas de vestir (camisas, jeans y camisetas), compuestas por fibras de algodón y poliéster. A continuación, realizaron la siembra hemática de patrón conocido sobre las telas, las cuales se pusieron a secar. Una vez secas y de manera individual fueron sometidas a diferentes procesos de lavado y secado, utilizando diferentes agentes limpiadores y temperaturas. Posteriormente ya con todas las muestras secas a cada una de ellas se le aplicó el reactivo luminol como método de revelado, luego se dejaron secar nuevamente. Por último, se extrajo una porción de tela de cada una para llevar a cabo la extracción y posterior análisis de ADN.

Edler, C, *et. al.* (2017) concluyeron que la eliminación de rastros de sangre en los textiles es más difícil de lo que generalmente se cree, incluso después de intensos lavado las concentraciones débiles de sangre pueden hacerse visibles mediante el uso de luminol, siendo posteriormente utilizadas para el análisis de ADN. Esto confirma la facilidad de uso del luminol para muestras latentes en tejidos lavados previamente.

Investigación III.

Efectividad del Luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del ADN.

Castelló, M, *et. al.* 2002, realizaron una investigación cuyo objetivo fue determinar la capacidad del reactivo luminol para localizar manchas de sangre invisibles y comprobar si de las manchas localizadas se puede extraer y analizar el ADN (Ácido Desoxirribonucleico).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Para ello se sembraron muestras de sangre de referencia sobre varios fragmentos de tela de color blanco que posteriormente se dejaron secar. Luego la totalidad de las muestras fueron sometidas a una serie de lavados a máquina con la utilización de detergente y suavizante, tras el lavado se dejaron secar al aire libre. Subsiguientemente ya con las muestras en estado seco se procede a la división las mismas en dos grupos, a uno de estos se le aplicó el luminol y se dejó secar al aire libre nuevamente; mientras que el otro grupo fue privado de la aplicación del reactivo. Por último, se extrae una porción de tela de cada una de las muestras involucradas para llevar a cabo la extracción de ADN y posterior análisis.

Como resultado se concluyó que el uso del luminol como reactivo de búsqueda tanto en la escena del crimen como en el laboratorio puede resultar muy útil por su capacidad de localizar manchas invisibles y se comprueba la no interferencia del reactivo en el análisis de ADN.

Investigación IV.

Análisis STR (Short Tandem Repeats – repeticiones cortas en tándem) posterior a la detección de muestras de sangre latente por medio del luminol, fluorescencia y blueStar.

Jakovich, C. (2006), realizó una investigación basándose en el análisis comparativo entre los reactivos de Luminol, Fluorescencia y BlueStar, estos se utilizan en el lugar del hecho para identificar posibles rastros latentes de sangre humana. Cuyo objeto fue aplicar dichos reactivos sobre diferentes soportes y posteriormente llevar a cabo el análisis de ADN.

A continuación, se detalla en resumen la metodología aplicada, se obtuvo sangre de un voluntario conocido, la cual fue colocada en las siguientes superficies: suela de zapato, palo de golf, machete y manos de un individuo, con la ayuda de una goma espuma, luego se limpiaron con un fragmento de tela y posterior enjuague con agua hasta que no hubo más rastros de sangre visible, seguidamente fueron frotados con un soporte final, siendo este una alfombra. Las alfombras se cortaron y se etiquetaron como "Luminol", "Fluorescencia" y "BlueStar", luego se dejaron secar durante cinco

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

días. Una vez secas, mediante hisopado se tomó una muestra de cada alfombra, y por último se realizó el estudio a ADN.

Jakovich, C. (2006) arribo a los siguientes resultados: se obtuvieron perfiles completos de todos los hisopos de alfombra, con la excepción de uno que mostró pequeñas cantidades de ADN durante la cuantificación. Debido al bajo rendimiento de ADN, no se pudo obtener un perfil completo para esa muestra. Por otra parte, concluyo que, habiendo obtenido perfiles completos independientemente del reactivo, no parecía haber ninguna diferencia significativa en los efectos de Luminol, Fluorescencia y BlueStar en el análisis.

Investigación V.

Efecto de los reactivos de pruebas presuntivas en las pruebas confirmatorias de sangre humana y el análisis de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Piva de Almeida, J et al. (2011) compararon los efectos del luminol (preparado según la técnica descrita por Weber et. al., 1991), Luminol 16 ®, BlueStar ® y Bencidina con el objeto de realizar una evaluación estandarizada sobre la inhibición de la prueba de antiglobulina humana, prueba inmunocromatográfica de hemoglobina y recuperación de ADN. El estudio radicó en el análisis de ADN de muestras de tejido hemático sometidas a los distintos reactivos presunción en distintos lapsos de tiempo.

A continuación de detalla resumidamente su metodología, partieron de sangre venosa la cual se sembró sobre tela blanca (100% algodón) que fue cortada en fragmentos de igual morfología (1cm. x 1cm.) y se dejó secar durante 48 horas a temperatura ambiente, luego de ello se aplicaron los cuatro reactivos mencionados, dejándose secar otras 48 horas. Las pruebas de confirmación y la cuantificación de ADN se realizaron a los días 1, 7, 30 y 120 posteriores a la aplicación de los reactivos.

Como resultado de la comparación de los efectos de los diferentes reactivos sobre el ADN, se puede comprobar que las muestras tratadas con Bencidina degradó en gran medida el ADN habiendo transcurrido solo 48 horas luego de su aplicación. Las muestras tratadas con Luminol y BlueStar ®, no degradan el ADN, pero sin

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

embargo disminuyen la cantidad de mismo de manera paulatina en el lapso de tiempo empleado (1 a 120 días). Por último, las muestras tratadas con Luminol 16 ® degradaron considerablemente el ADN a los 7 días.

Con ello demostraron que algunas pruebas presuntivas afectan la cantidad de ADN de la muestra después de unos meses, conduciendo a la degradación del mismo. Sin embargo, destacaron que cuando se analizan un gran número de muestras de presunto carácter hemático sean directamente sometidas a pruebas de presunción, ya que ahorran tiempo y dinero a la hora priorizar las muestras para análisis de ADN.

Por último, Piva de Almeida, J et al. (2011) concluyen que las mejores pruebas presuntivas generales fueron luminol preparado según Weber y Bluestar ® Forensic, porque degradaron el ADN en menor medida. En consecuencia, dependiendo de la cantidad de material biológico disponible, puede que la degradación causada por estos reactivos impida determinar de un perfil genético completo.

Investigación VI.

Evaluación de seis pruebas presuntivas para sangre, Su especificidad, sensibilidad y efecto en alta ADN de peso molecular.

Shanan, S, et. al. (2007), Realizaron el análisis de especificidad, sensibilidad y extracción de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de muestras diluidas de sangre, a las cuales se les aplico seis reactivos presuntivos para su identificación. Estos reactivos también fueron aplicados a sustancias que generan resultados de falsos positivos. A continuación, se detalla brevemente los métodos y conclusiones obtenidas.

Por un lado, las disoluciones de sangre (de un donante conocido), fueron sembradas en pequeños papeles de filtro las cuales se dejaron secar, luego a cada una de ellas se les aplicaron los siguientes reactivos: Luminol, Verde leucomalaquita, Fenoltaleína, Hemastix ®, Hemident TM y Bluestar ®, con la finalidad de identificar si la sangre presente era detectable. Por otro lado, dichos reactivos también fueron aplicados en sustancias que dan resultados falsos positivos o sustancias que puedan confundirse con Sangre. Los seis reactivos se probaron contra saliva, semen, patata, tomate, salsa de tomate, salsa de tomate con carne, cebolla morada, frijol rojo, rábano picante, ácido ascórbico 0,1 M, lejía al 5%, 10% de sulfato cúprico, 10% de sulfato

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

férrico y 10% de cloruro de níquel. Posteriormente se analizaron las muestras para determinar si las pruebas presuntivas degradaron el ADN (Ácido Desoxirribonucleico).

Como resultado concluyeron que de todos los reactivos utilizados el mejor fue luminol, ya que posee mayor sensibilidad y especificidad, también se comprobó que no destruyó el ADN (Ácido Desoxirribonucleico), mientras que el BlueStar ® tiene buena sensibilidad, pero muy poca especificidad. La necesidad de una oscuridad total para su uso complica aún más, esto es porque incluso si una mancha no parecía sangre, reaccionaría de la misma manera y podría confundirse con sangre.

Investigación VII.

El efecto de los agentes blanqueadores en el análisis de ADN de las manchas de sangre en diferentes revestimientos.

Edler, C et. al. 2019. Esta investigación se basó en la utilización de agentes blanqueadores, ya que los autores de un delito violento luego de cometerlo tratan de borrar los indicios haciendo uso de productos de limpieza encontrados en el hogar, como consecuencia de tales actos se ha informado que los agentes blanqueadores al igual que el reactivo Luminol causan degradación del ADN, es por ello que continuación se detallan en resumen los procedimientos y conclusión del presente estudio.

El ensayo se realizó con un total de cinco soportes PVC, baldosas, laminado, parquet y alfombra, a los cuales se le aplica sangre humana conocida, una vez que la muestra se encuentra seca se procede a limpiar los soportes con diverso blanqueadores de características oxidativas en altas y bajas concentraciones, tales como: peróxido de hidrogeno o agua oxigenada (H_2O_2) al 3% y 30 %, "Vanish Oxi Action®" (basado en oxígeno); otros blanqueadores basados en compuestos de cloro tal como Hipoclorito de sodio al 13% e "DanKlorix®" producto de limpieza (2,8% de hipoclorito de sodio), los cuales fueron aplicados en tres concentraciones (puro, 1:10 y 1:100) con un determinado tiempo de exposición. Seguidamente, ya con todas las superficies secas se realizó el levantamiento de muestras para su posterior análisis de ADN.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

En resumen, se concluyó que el uso de agentes blanqueadores causó una reducción en las concentraciones de ADN, obteniendo perfiles parciales y completos solo en los casos factibles después de usar 3% de peróxido de hidrógeno, como así también que la mayor concentración de ADN tiende a encontrarse en una dilución más alta del agente blanqueador y/o mayor cantidad de sangre añadida.

Investigación VIII.

El efecto del Luminol en las pruebas presuntivas y el análisis de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

Gross, M et. al. 1999, Este estudio se diseñó para probar los factores involucrados en el procesamiento de evidencia manchada de sangre y posterior aplicación de Luminol, como así también el efecto de diferentes limpiezas de varios sustratos con sangre sobre la capacidad de obtener ADN adecuado para pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Por otra parte, la capacidad de extraer ADN de sustratos manchados de sangre tratados con Luminol usando tres técnicas de extracción.

Estos investigadores concluyeron en el hallazgo de que el Luminol no afectó negativamente las pruebas de PCR y no interfirió con las pruebas presuntivas para la sangre y se determinó que el sustrato y el método de limpieza fueron los principales factores que afectaron el rendimiento del ADN, como así también la capacidad de escribir las manchas de sangre utilizando tecnologías basadas en PCR.

Marco teórico.

A continuación, se expondrán los conceptos necesarios para comprender el desarrollo de la investigación y que serán ampliados a lo largo del trabajo.

Sangre.

La sangre puede considerarse un tejido especializado, que está constituido por 55% de sustancia intracelular líquida denominada **plasma sanguíneo** y 45 % de elementos figurados o sólidos conocidos bajo el nombre de **células**. La sangre es un fluido de aspecto viscoso y coloración rojiza, que circula a través del organismo por

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

medio de vasos sanguíneos, cumpliendo determinadas funciones tales como: respiración, nutrición, propiedad excretora, inmunitaria, propiedad reguladora de hormonas, térmica, equilibrio hídrico y presión tanto osmótica como arterial. (Brûel A. et.al.2015), (Sáez ,2017) y (Palacios, 2009).

Propiedades físicas.

La viscosidad de la sangre no es constante debido a los cambios de presión y temperatura. Esta propiedad es aproximadamente cuatro veces mayor que el agua, gracias a la carga electronegativa de los eritrocitos; Otra propiedad es la tensión superficial causada por la unión de las mismas moléculas que se encuentran en el líquido al resistir la separación provocando así un aumento de la fuerza, esta tensión es responsable de que la gota continúe esférica en vuelo; por último, su densidad es muy similar al agua: 1,06 g/cm³, cuando el agua tiene 1 g/cm³. La densidad es la proporción de la masa de una sustancia y su volumen, esto explica que, a mayor masa mayor será su resistencia. (Sniegovski M.M. et.al.2017).

Estas propiedades son de utilidad para comprender la metodología producido en el lugar del hecho, ocasionadas eventualmente por caídas, por depósito, o impacto, las cuales dependerán de estas propiedades: viscosidad, tensión superficial y la densidad. (Sniegovski M.M. et.al.2017).

Sustancia intracelular de la sangre.

El plasma sanguíneo es un fluido líquido de color amarillento constituido por 91-92% de agua, 7-8% de proteínas (fibrinógeno, albumina, globulina) y 1-2 % de otros solutos tales como electrolitos, sustancia nitrogenada, nutrientes de gases sanguíneos y sustancias reguladoras de hormonas. La función principal del plasma es el transporte de alimentos, hormonas, y proteínas a distintas partes del cuerpo. También transporta los residuos del metabolismo de la célula de diversos tejidos a los órganos responsables de desintoxicarlos y/o de excretar. Además, es el medio por el cual se transportan de los glóbulos a través de los vasos sanguíneos. (Brûel A. et.al.2015).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Elementos figurados o porción sólida de la sangre.

La porción figurada de la sangre hace referencia a sus tipos celulares, los cuales se distribuyen en eritrocitos o glóbulos rojos, plaquetas o trombocitos y leucocitos o glóbulos blancos, destacando que este último posee dos grupos de diferenciación celular (Granulocitos y Agranulocitos). (Brûel A. et.al.2015)

Los glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes) son células a nucleadas de mayor abundancia en la sangre, presentan forma de disco bicóncavo. Su función principal se desarrolla en el torrente sanguíneo, la cual radica en el transporte de oxígeno (O_2) desde los pulmones a los tejidos y del Dióxido de carbono (CO_2) de los tejidos a los pulmones, a través de los vasos sanguíneos. Esta función se debe a que el citoplasma se encuentra lleno de hemoglobina, proteína que le otorga el color rojizo característico, esto es gracias a las cuatro unidades de grupo hemo ricos en hierro. La proteína sólo puede transportar oxígeno cuando el hierro se encuentra en estado ferroso, sin embargo, también posee hierro en forma férrica (Fe^{3+}) siendo incapaz de transportar oxígeno. (Sáez ,2017) y (Palacios, 2009).

Las plaquetas o trombocitos son fragmentos citoplasmáticos que pueden presentarse en forma de discos biconvexos, redondos u ovoides, desempeñan dos papeles importantes, uno es contra la hemostasia, es decir que participan en la prevención y detección de la hemorragia; y el otro frente al mantenimiento de la integridad del endotelio vascular, es por ello que ante un corte u otra lesión en el vaso sanguíneo, éste se contrae deteniendo en un principio la hemorragia y luego las plaquetas forman un tapón denominado placa trombótica que cubre la lesión del vaso, formándose posteriormente un coágulo evitando la pérdida de sangre. (Brûel A. et.al.2015), (Sáez ,2017) y (Palacios, 2009).

Los glóbulos blancos o también llamados leucocitos son células con núcleo a diferencia de las plaquetas y hematíes. La función principal se lleva a cabo fuera del torrente sanguíneo, ya que son las unidades móviles del sistema de protección asociadas a funciones inmunitarias del cuerpo, tales como situaciones alérgicas e infecciones por parásitos. Estas células poseen cierta diferenciación celular, las cuales se agrupan en granulocitos y agranulocitos. (Sáez ,2017) y (Palacios, 2009).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

En términos forenses esta célula se destaca de las anteriores, gracias a su contenido nuclear rico en Ácido desoxirribonucleico (ADN). El núcleo es la estructura más destacada de una célula, ya que en él se almacena el ADN, dicho en otras palabras, se almacena la información genética o también llamado genoma, cuya función principal es dirigir el desarrollo, regulación y funciones de cada célula. (Brûel A. et.al.2015).

Ácido desoxirribonucleico.

La estructura del Ácido desoxirribonucleico (ADN) está formada por dos cadenas helicoidales enrolladas en sentido horario o dextrógira de polinucleótidos en direcciones opuestas, unidas mediante enlaces puente de hidrogeno, dando origen a una doble hélice complementaria de ADN. Una cadena de ADN es un polímero lineal de nucleótidos unidos covalentemente por medio de enlaces fosfodiéster 3' a 5', y a su vez un nucleótido está formado por la unión de tres moléculas: una azúcar de cinco carbonos "desoxirribosa", un grupo fosfato y una base nitrogenada, las cuales se distinguen: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). (Blanco A.,2016) y (Curtis H. et.al.,2008).

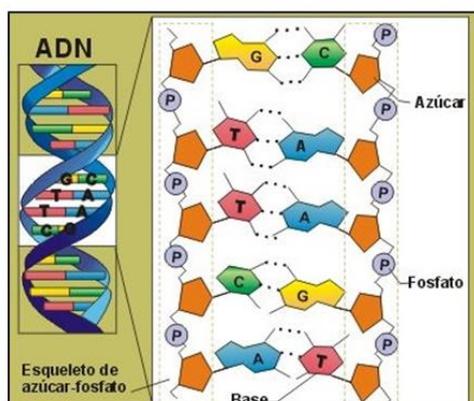


Figura 1. Estructura de ADN doble hélice.

Recuperado:

http://matemat.ieslamarina.org/antiguos/Cine_mate/s/Gattaca/Gatt_11_c_BIO.htm.

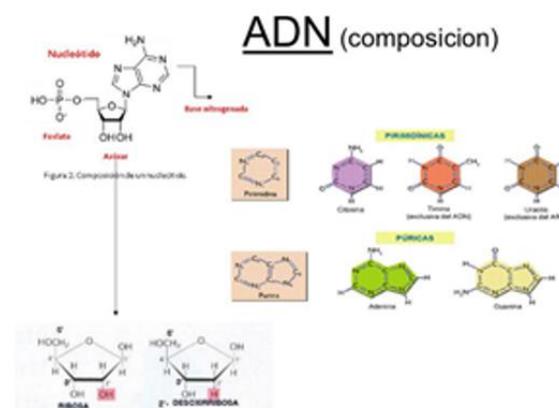


Figura 2. Composición de una cadena de ADN

Recuperado: <https://slideplayer.es/amp/13078195/>

La información genética está contenida en la molécula de ADN, "cifrada" o "codificada" en su secuencia de bases: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C), esto es de gran importancia para el estudio de este, ya que las posibilidades- de

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

ordenamiento pueden dar cuenta de la enorme variabilidad de los seres vivos. (Blanco A.,2016) y (Curtis H. et.al.,2008).

Importancia para las ciencias forenses.

La ciencia forense que estudia el ADN es la genética forense, la cual se encarga del análisis de los polimorfismos responsables de la variabilidad genética en la población humana aplicados a los problemas judiciales, tales como investigaciones de paternidad, investigaciones criminales especializadas en homicidios y delitos sexuales; o bien en la identificación de restos cadavéricos. El ADN se utiliza para conocer la secuencia de eventos, los puntos clave del crimen e incluso el móvil. (Rodríguez C. et.al.,2010).

El Ácido desoxirribonucleico es una de las herramientas más importantes para esta ciencia, ya que a partir de él y gracias al proyecto genoma humano se puede identificar un individuo. Este proyecto fue un plan internacional cuyo propósito fue determinar la secuencia de pares de bases y a su vez establecer el espacio físico y funcional de los genes dentro del genoma humana permitiendo así identificar la variabilidad genética. En virtud de ello, se pueden utilizar diversa técnica de la genética forense para identificar a una persona a través de la comparación entre la muestra de referencia y las muestras halladas en la escena del crimen. (Nussbaum et. at., 2008).

Muestras biológicas relevantes para la obtención de ADN.

Al momento de inspeccionar la escena del crimen o lugar del hecho, donde se sospecha que ha ocurrido un acto violento, los indicios relevantes para la obtención de ADN suelen ser de origen biológico, tales como: la sangre, la saliva, fluido seminal, fluidos mixtos (semen-sangre-epitelios) tanto en estado fresco como en soporte sólido, como así también tejido cadavérico, musculo, piel, huesos, uñas, filamentos pilosos y dientes. Los menos notables son aquellos que se encuentran en: peines, cepillo de ropa, de dientes, de uñas, tarjetas, sobres, colillas, restos de utensilios (vasos, tazas, cubiertos, afeitadoras, etc.), así como también en prótesis dentales, cosméticos, ropas, calzados, anillos, relojes, etc. La obtención de DNA de estos últimos es más difícil porque existe un grado alto de contaminación ambiental y la muestra puede ser escasa. (Rodríguez C. et.al., 2010) y (Caro P., 2004).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Evolución de las técnicas de análisis de ADN.

Con el pasar de los años el avance tecnológico, el desarrollo de las técnicas y la mejora de estas, llevo a que el análisis del ADN sea cada vez más sensible, capaz de detectarse o evidenciar trazas muy escasas del mismo. A continuación, se mencionará en resumen el desarrollo tecnológico de acuerdo con la sensibilidad y visibilidad de las muestras. (Prieto Solla L. et. al., 2019).

Las primeras técnicas se utilizaron para analizar manchas de sangre perceptibles al ojo humano, (superiores a dos centímetros), tales como el análisis de grupos sanguíneos y proteínas (1900) y el uso de la huella genética (1985). Ambas se destacan por haber sido utilizadas en una investigación criminal que tuvo condena firme en el año 1988. (Prieto Solla L. et. al., 2019).

Luego en el año 1991, surge la técnica del análisis de ADN autosómico, la cual utiliza regiones de ADN muy variables, denominadas Repeticiones cortas en tándem o STRs, de su nombre en inglés *Short Tandem Repeats*, obteniéndose un perfil genético a corto plazo de tiempo, la cual se utilizó para pequeños rastros visibles de sangre. En la actualidad esta técnica es una de las más aplicadas en el campo forense. (Prieto Solla L. et. al., 2019 y Crespillo Márquez M.C. et. al; 2020).

Posteriormente, aparecieron las técnicas destinadas a casos donde la evidencia era escasa o latente, como ser el análisis del ADN mitocondrial y El análisis del cromosoma Y (1996). El primer análisis radica en analizar el ADN presente en las mitocondrias (fabrica energética), ubicada dentro de las células humanas. Este se transmite en línea materna de la familia, y por lo tanto se utiliza en circunstancias de catástrofes masivas o cuando el ADN haya sido afectado por agentes ambientales (calor, luz, humedad, etc.) (Prieto Solla L. et. al., 2019).

En cuanto al análisis de Cromosoma Y, propio linaje paterno y por ende solo está presente en el sexo masculino, es otra de las técnicas más aplicadas en genética forense en casos de crímenes violentos y/o de agresión sexual, dado que brinda información sobre el posible componente masculino de una muestra. (Prieto Solla L. et. al., 2019) y (Crespillo Márquez M.C. et. al; 2020).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Después surgió el método de análisis denominado “*LOW TEMPLATE ANALISIS*” (2000), destacado por su gran sensibilidad, siendo utilizado para muestras con escasa cantidad de ADN. (Prieto Solla L. et. al., 2019).

Un año después emergió la técnica de búsqueda familiar, cuya aplicación se basa en buscar coincidencia parcialmente entre el perfil obtenido de una muestra del lugar del hecho con el de un perfil cargado a la base de datos, esta técnica puede encontrar una coincidencia total. (Prieto Solla L. et. al., 2019).

Además, en el año (2003) se desarrolló el análisis de polimorfismos de un único nucleótido o *SNPs*, de su nombre en inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*. Como los *SNPs* son más pequeños que los *STRs*, el análisis se aplica cuando las muestras con ADN muy deteriorado, como ser huesos antiguos. Pronto en el año 2005, nacieron las pruebas de ascendencia biogeográfica ofrecen información sobre el origen ancestral de un individuo, pero solo es posible diferenciar entre amplias regiones geográficas. (Prieto Solla L. et. al., 2019).

Por último, se mencionan las técnicas más actuales, iniciándose en el año 2008 y aún se encuentran en desarrollo, están dirigidas a la obtención de un perfil genético de muestras con rastros invisibles al ojo humano o de escasa cantidad biológico normalmente producidos al tocar un objeto, corrientemente conocidas como “ADN de toque”.

También en ese año se empezó a utilizar la prueba de ADN para predecir ciertas características fenotípicas del individuo tales como: el color de ojos, del pelo, etc. Cuyo propósito en la actualidad es de ser empleada en las investigaciones forenses de forma excepcional. Además, están las pruebas de estimación de edad, a fin de acortar el rango de posibles sospechosos y la secuenciación de nueva generación con el objeto de mejorar la capacidad de trabajar con mezclas de ADN de más de una persona. (Prieto Solla L. et. al., 2019).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Luminol.

Historia del Luminol.

El Luminol se introduce en la criminalista gracias al ensayo accidental producido en 1928 por el alemán H.O. Albrecht, quien como resultado de la combinación de ciertos compuestos descubre el 5-amino-2, 3-dihidro-1, 4 ftalacindonia, una sustancia que emite una tenue luz azul brillante al mezclarse con peróxido de oxígeno (H_2O_2) en presencia de un catalizador como el cobre (Cu^{+2}), el cobalto (Co^{+3}) o el hierro (Fe^{+2}). (James SH et. al. 2005) y (Cuello Videla OA. et. al. 2015).

La luz es causa del desprendimiento de energía que se daba en la naturaleza, el hecho de obtener luz en forma artificial mediante químicos recibió el nombre de quimioluminiscencia, a consecuencia el reactivo se comenzó a utilizar en el área minería, con el objeto de facilitar la búsqueda de vetas de cobre en diversos puntos de Alemania. (James SH et. al. 2005) y (Cuello Videla OA. et. al. 2015).

Gracias a lo expuesto en el año 1937 en manos del Dr. Walter Spech, de la Universidad de Medicina Legal y Criminalística de Jena (Alemania), se comenzó a utilizar el Luminol en distintos test de detección de sangre sobre superficies, tales como: pavimentos, ladrillos, paredes, etc. Debido a que en la mayoría de los casos se obtenían resultados negativos, frente a la búsqueda de tales indicios, de esta forma descubrieron la gran efectividad del reactivó al detectar sangre en la mayoría de estas pruebas. En el año 1951 el Luminol ya se aplicaba en distintos casos como herramienta puntera de la investigación criminal. (James SH et. al. 2005) y (Cuello Videla OA. et. al. 2015).

Luego en el año 1966, Weber propone su mezcla para el Luminol en base de hidróxido de sodio o potasio en un medio hidratado de agua destilada y peróxido de hidrogeno, dando como resultado un Luminol sensible a cambios en la temperatura, y de corta vida útil, siendo esta técnica la más utilizada en el campo de la Criminalística y ciencias como la Medicina Legal y Forense de todo el mundo hasta la llegada de nuevas fórmulas (de misma base a la de Weber), patentadas por firmas comerciales. (Cuello Videla OA. et. al. 2015). y (Kdenyss k. et al. 2014).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

¿Qué variantes existen del reactivo?

Actualmente existen variantes de obtención de Luminol, por un lado, mediante la fórmula casera de Grodsky y Weber, y otras de venta comercial como por ejemplo *Bluestar Forensics*, producto reconocido en el ámbito criminalístico, el cual gracias al aporte del Bioquímico Loic Blum se logró agilizar parte de la reacción y del manejo del producto para su mejor uso y comercialización. (Cuello Videla OA. et. al. 2015). y (Kdenyss k. et al. 2014).

¿Qué es el Luminol y para que se utiliza?

Es un compuesto heterocíclico ($C_8H_7N_3O_2$) en estado sólido de color amarillo claro, soluble en agua, como así también en una cierta cantidad de solventes orgánicos, que se caracteriza por presentar quimioluminiscencia, la cual se identifica por la emisión de un brillo de coloración azulada, esta característica llevo a que el mismo sea utilizado con diversos fines como por ejemplo la determinación de peróxido de hidrogeno en el tratamiento de aguas residuales, en la determinación de tiroxina y en técnica inmunosquímicos e inmunoenzimáticos. Sin duda una de las aplicaciones más destacable fue en el campo de las ciencias forenses en la búsqueda de indicios biológicos tales como sangre en la escena del crimen. (James SH et. al. 2005) y (Maldonado et. al. 2006).

Este producto de basa en reacciones químicas oxido- reducción, cuando entra en contacto con el grupo hemo presente en la sangre este cataliza la descomposición del agente oxidante donde los productos generados excitan al Luminol y la energía se emite en forma de luz. (James SH et. al. 2005) y (Maldonado et. al. 2006).

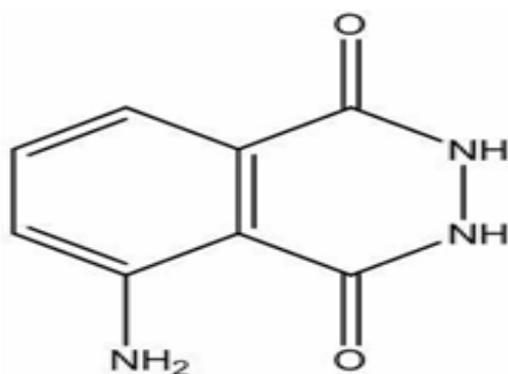


Figura 3. Molécula del Luminol
Extraída de Maldonado et. al. 2006.

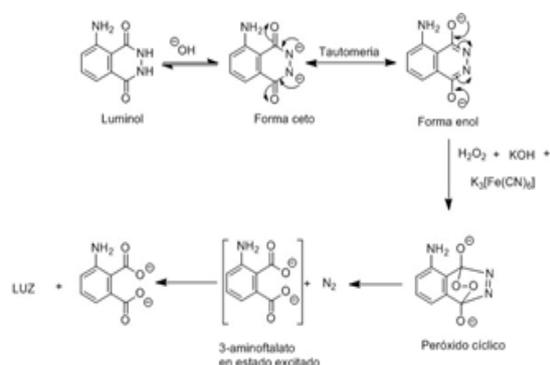


Figura 4. Reacción Química del Luminol
Extraída de Maldonado et. al. 2006.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Importancia del Luminol en Criminalística.

La aplicación directa de este reactivo sobre un área con sangre no produce luminiscencia por sí solo, para que eso suceda debe ser activado, esto ocurre preparando una solución acuosa de Luminol con agente oxidante, como el agua oxigenada (H_2O_2) y un hidróxido que proporcione un medio básico. Una vez activo el Luminol se encuentra en un estado excitado alcanzando su estado basal, como resultado se libera energía en forma de luz de color azul fluorescente, esta reacción ocurre lentamente, pero en presencia de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}), uno de los metales presentes en la hemoglobina de la sangre, se acelera la reacción y por ende la luz se produce de manera inmediata al contacto. (Zenteno et. al. 2017) y (Sniegovski M. et. al. 2017).

Debido a lo expuesto anteriormente, este reactivo es utilizado para revelar máculas latentes (diluidas por lavado) de trazas de sangre en diversas superficies (lisas, porosas, absorbentes, etc.), como así también pequeñas cantidades de sangre que no son visibles al ojo humano, ya sea en el lugar de los hechos como así también en el laboratorio. (James SH et. al. 2005), (Cuello Videla OA. et. al. 2015) y (Kdenyss k. et al. 2014).

El Luminol también arroja resultados positivos frente a diversos materiales, tales como raíces vegetales, tinturas/colorantes, metales o productos de limpieza. Sin embargo, la quimioluminiscencia producida de la interacción del Luminol con estos materiales disminuye hasta desaparecer en un período de tiempo no mayor a 1 minuto, este efecto es conocido como Falso-Positivo. Por otro lado, es importante mencionar que el Luminol no reacciona frente a fluidos corporales tales como sudor, saliva, semen y orina, mientras que en contacto con tejido hemático la quimioluminiscencia aumenta lentamente su brillo durante un periodo de varios minutos. (Cuello Videla OA. et. al. 2015) y (Kdenyss k. et al. 2014).

La detección de manchas hemáticas tanto en la escena del crimen como en el laboratorio son vitales en la investigación criminal, ya que el tejido hemático es uno de los fluidos corporales comúnmente estudiados en la ciencia forense, debido a que es

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

hallado con frecuencia en las escenas del crimen de carácter violento. (Cuello Videla OA. et. al. 2015).

Metodología.

Este trabajo tuvo un enfoque cuantitativo, aplicando procesos cuidadosos, metódicos y empíricos, con el objeto de generar conocimiento. El diseño de la investigación fue experimental, ya que se desarrolló en un contexto determinado, donde existe manipulación intencional de las variables independientes con características propias y elementos de control.

La población de estudio del presente estuvo constituida por las diferentes superficies que hacen parte de la escena del crimen, donde se pueden hallar rastros biológicos como producto actos criminales y aquellos agentes que son utilizados para erradicar la evidencia. Se seleccionaron cuatro soportes de superficie lisa, porosa, metálica y absorbente, que fueron contaminados con sangre humana (muestra de referencia), estos fueron sometidos a los siguientes procedimientos. En primer lugar, se lavaron con esponja y de dos agentes blanqueadores (detergente y lavandina) disueltos en agua y, en segundo lugar, se les aplicaron dos tipos de reactivo Luminol, uno preparado mediante la fórmula casera de Grodsky y el otro de marca registrada BLUESTAR® FORENSIC.

Por último, y de acuerdo con la combinación entre los tipos de lavados y reactivos de Luminol aplicados, se realizó el levantamiento o sustracción de una muestra por soporte obteniéndose un total de cuatro muestras, a fin de conformar la unidad de análisis en esta investigación y así proceder a la tipificación de ADN tanto autosómico como de Cromosoma Y.

La tipificación de ADN se realizó siguiendo las siguientes etapas: Extracción de ADN, cuantificación de ADN, amplificación de STRs autosómicos y de cromosoma Y mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), separación electroforética de los fragmentos amplificados y análisis de los perfiles obtenidos.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Métodos.

Obtención de la muestra de sangre humana.

La muestra de sangre se obtuvo de un voluntario masculino, al cual se le realizó una extracción de 10 ml de sangre periférica, por punción venosa en forma estéril. La sangre obtenida fue colocada en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante.

Preparación de muestras.

Este paso consiste en poner en contacto directo la muestra de referencia con los soportes seleccionados, los cuales poseen superficies diferentes (absorbente, lisa, metálica y porosa), siendo estas las más encontradas en el lugar del hecho o escena del crimen.

Comenzando con la preparación del soporte absorbente, en este caso se utilizó una toalla de uso cotidiano de color blanco, la cual se recortó en cuatro fragmentos de morfología rectangular de aproximadamente 13 cm de largo por 10 cm de ancho. Luego a cada una fueron rotuladas con números romanos: "I", "II", "III" y "IV", para finalizar se vertió sobre cada uno cuatro gotas de la muestra de referencia. Ver la siguiente figura fotográfica.

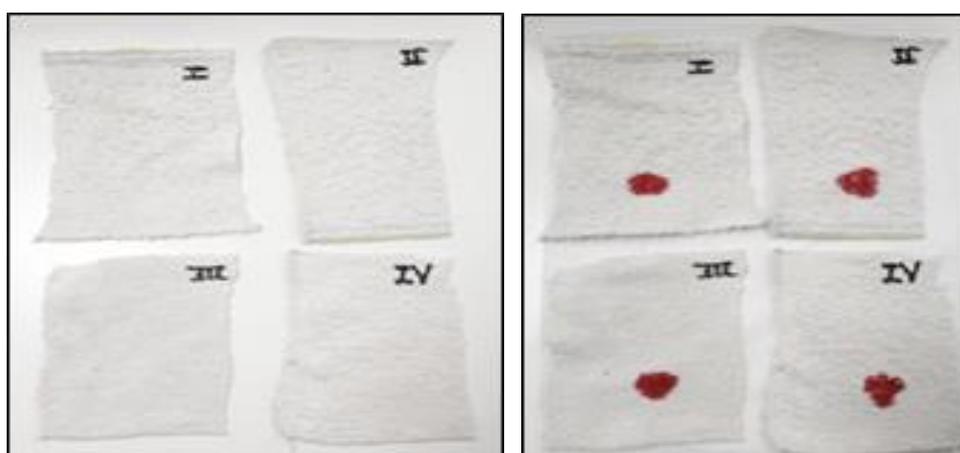


Figura 5. Soportes absorbentes, puesto en contacto con la muestra de referencia.

Seguidamente se acondicionó el soporte de superficie lisa, para esto se tomaron cuatro cerámicas símil adorno, que presentan dibujos en bajo relieve en tonos claros y oscuros, de morfología circular cuyo diámetro aproximado es de 5 cm; siendo

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

discriminados también con números romanos: “I”, “II”, “III” y “IV”. Luego a cada uno se le aplicó cuatro gotas de la muestra de referencia. Ver la figura aportada.

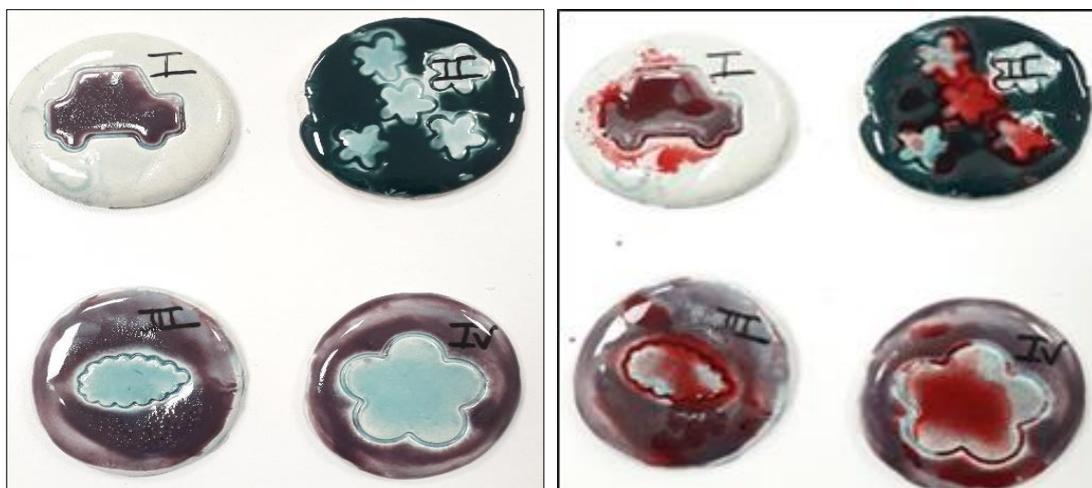


Figura 6. Soporte de superficie lisa, puesto en contacto con la muestra de referencia

A continuación, se prepararon los soportes metálicos, para ello se eligieron cuatro llaves de color plateado, cuyo cabezal presenta 2,2 cm de diámetro; mientras que el cuerpo posee 8,2 cm de longitud, también se les asignó un rótulo en número romano “I”, “II”, “III” y “IV” y se les vertió cuatro gotas de la muestra de referencia. Ver figuras adjuntas.



Figura 7. Soporte de superficie metálica y acanalada, puesto en contacto con la muestra de referencia

Por último, se preparó el soporte poroso tratándose en este caso de un fragmento de madera de color marrón oscuro, de 20 cm de largo cm por 7 de ancho por 2 cm de alto, a diferencia de los soportes anteriores, este fue subdividido en cuatro cuadros de 5 cm aproximadamente, ya que el mismo no se pudo cortar, para finalizar

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

a cada cuadro también se les aplicó cuatro gotas de la muestra de referencia y se los identificó con numeración romana "I", "II", "III" y "IV".

Cabe aclarar que no existió riesgo de contaminación entre las subdivisiones, ya que todas las siembras hemáticas se realizaron a partir de la sangre extraída al mismo voluntario. Ver figura adjunta.

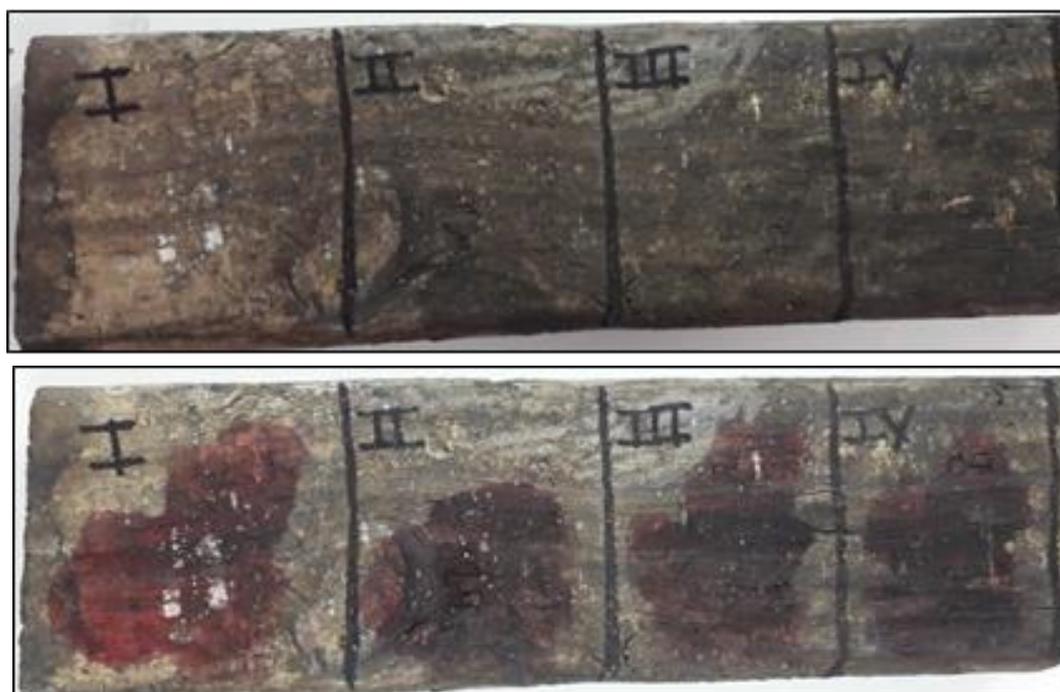


Figura 8. Soporte de superficie de madera y absorbente, puesto en contacto con la muestra de referencia.

Finalizando con la preparación de muestra a cada uno de los soportes involucrados se los dejó secar a temperatura ambiente por un término de 24 horas, en condiciones ambientales controladas para evitar contaminación, con la finalidad de ajustar el tiempo como si fuera la escena del crimen.

Como resultado de lo expuesto se han depositado dieciséis muestras de sangre humana, las cuales se encuentran distribuidas en cuatro soportes diferentes conformándose cuatro grupos, el **grupo "I"** formado por: toalla I, cerámica I, llave I y madera I; **el grupo "II"** por: toalla II, cerámica II, llave II y madera II; **grupo "III"** por: toalla III, cerámica III, llave III y madera III, y por el último **grupo "IV"** por: toalla IV, cerámica IV, llave IV y madera IV. Esta conformación de grupos se pensó como una forma de identificación de cada soporte, en virtud de la cantidad de muestras y de

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

soportes que se repiten, para graficar la distribución de los grupos se elaboró la siguiente matriz.

Tabla 1.

Presentación de los soportes utilizados y la cantidad de muestras por cada grupo.

IDENTIFICACIÓN DE SOPORTE POR GRUPO	TIPO DE SOPORTE	N ° TOTAL DE MUESTRAS SEMBRADAS
GRUPO I	TOALLA I	4
	CERAMICA I	
	LLAVE I	
	MADERA I	
GRUPO II	TOALLA II	4
	CERAMICA II	
	LLAVE II	
	MADERA II	
GRUPO III	TOALLA III	4
	CERAMICA III	
	LLAVE III	
	MADERA III	
GRUPO IV	TOALLA IV	4
	CERAMICA IV	
	LLAVE IV	
	MADERA IV	

Lavados / limpieza de muestras.

En esta etapa se llevó a cabo la limpieza de cada uno de los soportes mencionados anteriormente, los cuales previamente tuvieron contacto con la muestra de sangre humana y se dejaron secar por 24 hs. La limpieza de cada soporte se realizó de forma manual y se utilizaron agentes blanqueadores de uso cotidiano diluidos en agua, tales como lavandina y detergente, ya que son los blanqueadores más utilizados para eliminar aquellas manchas de interés la escena del crimen.

Para este trabajo se escogieron dos tipos de lavado, mediante uso de una esponja símil goma espuma y la utilización de dos blanqueadores combinados con agua, discriminados como **“LAVADO 1”** y **“LAVADO 2”**.

Para el primero lavado se preparó una solución con agua de grifo y detergente de marca **“MAGISTRAL”**, que fue aplicado sobre los soportes del GRUPO I (toalla I, cerámica I, llave I y madera I) y del GRUPO III (toalla III, cerámica III, llave III y madera

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

III), mediante el uso de una esponja símil goma espuma bajo la técnica de raspado para generar fricción, a fin de erradicar toda la muestra depositada en cada soporte, a excepción del soporte de toalla del grupo I y del grupo III donde la fricción se realizó a mano. Por último, todos ellos se dejaron secar por cinco días.

El “LAVADO 2” constituyó en una mezcla de agua de grifo y lavandina de marca “DISLIMP”, de concentración 55g Cl/L, a diferencia del lavado anterior este se vertió sobre los soportes del GRUPO II (toalla II, cerámica II, llave II y madera II) y del GRUPO IV (toalla IV, cerámica IV, llave IV y madera IV), mediante el uso de una esponja símil goma espuma bajo la técnica de raspado para generar fricción, a fin de erradicar toda la muestra depositada en cada soporte, a excepción del soporte de toalla del grupo II y del grupo IV donde la fricción se realizó a mano. Por último, todos ellos se dejaron secar por cinco días. Ver las figuras adjuntas.



Figura 9. Vista fotográfica de los lavados realizados a mano y por fricción con la ayuda de una

Es importante remarcar que entre los DIECISÉIS (16) lavados efectuados, se empleó el correspondiente cambio de guantes y de esponjas, con el objeto de evitar alguna contaminación por parte del técnico. También se destaca que las soluciones

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

fueron preparadas de forma incierta, ya que se trató de que sean las soluciones que un autor puede preparar en el lugar de los hechos, en virtud del estado de euforia o adrenalina en el que se encuentra, no tiene presente las proporciones de los blanqueadores aplicados.

Para finalizar se adjunta la siguiente tabla donde se detalla el tipo y mecánica del lavado realizado a cada uno de los grupos (I, II, III y IV), conformados por los soportes ya mencionados.

Tabla 2.

Representación del tipo y mecánica de lavado realizado a cada soporte.

IDENTIFICACIÓN DE SOPORTE POR GRUPO	TIPO DE SOPORTE	MECANICA DE LAVADO	TIPO DE LAVADO
GRUPO I	TOALLA I	A MANO	LAVADO 1
	CERAMICA I	FRICCIÓN	
	LLAVE I	FRICCIÓN	
	MADERA I	FRICCIÓN	
GRUPO II	TOALLA II	A MANO	LAVADO 2
	CERAMICA II	FRICCIÓN	
	LLAVE II	FRICCIÓN	
	MADERA II	FRICCIÓN	
GRUPO III	TOALLA III	A MANO	LAVADO 1
	CERAMICA III	FRICCIÓN	
	LLAVE III	FRICCIÓN	
	MADERA III	FRICCIÓN	
GRUPO IV	TOALLA IV	A MANO	LAVADO 2
	CERAMICA IV	FRICCIÓN	
	LLAVE IV	FRICCIÓN	
	MADERA IV	FRICCIÓN	

Preparación de reactivos.

Esta etapa radicó en la preparación de los reactivos de luminol que fueron posteriormente aplicados sobre los distintos soportes, los cuales previamente fueron sometidos a el lavado “1” (agua + detergente) o al lavado “2” (agua +lavandina), siendo discriminados como: “**REACTIVO 1**” (Bluestar® Forensic) y “**REACTIVO 2**” (Luminol

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

casero preparado mediante la fórmula de Grodsky). Consultar su preparación en el ANEXO I.

Aplicación de reactivos.

En esta fase se llevó a cabo la aplicación de los reactivos de luminol preparados anteriormente y detallados en el ANEXO I, realizándose de la siguiente forma:

El “**REACTIVO 1**” (Bluestar® Forensic), fue aplicado sobre los soportes que conforman el **grupo I** (toalla I, cerámica I, llave I y madera I), los cuales han sido sometidos al “**LAVADO 1**”; como así también sobre los soportes pertenecientes al **grupo II** (toalla II, cerámica II, llave II y madera II), que en este caso fueron limpiados con el “**LAVADO 2**”.

Por otra parte, el “**REACTIVO 2**” (Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky), se dispersó sobre los soportes que pertenecen al **grupo III** (toalla III, cerámica III, llave III y madera III), los cuales fueron sometidos al “**LAVADO 1**”, como así también sobre los soportes pertenecientes al **grupo IV** (toalla IV, cerámica IV, llave IV y madera IV), los cuales fueron sometidos al “**LAVADO 2**”.

Previamente a la aplicación de cada uno de los reactivos de Luminol se realizó un ensayo de control positivo y de control negativo, con la finalidad de evaluar la efectividad de los mismos.

Luego se prosiguió con la aplicación de los reactivos, indistintamente del tipo de luminol a trabajar se acondicionó un ambiente de oscuridad plena, evitando así la filtración de luz natural y/o artificial, con el objeto de simular la escena del crimen.

Para llevar a cabo dicha aplicación se eligió un sector de trabajo donde se procedió a agrupar los soportes correspondientes al **grupo I** (toalla I, cerámica I, llave I y madera I), que fueron previamente sometidos al “**LAVADO 1**”; y los soportes del **grupo II** (toalla II, cerámica II, llave II y madera II), a los cuales se les aplicó el “**LAVADO 2**”. Teniendo la totalidad de los soportes se les aplicó en forma directa por aspersión con la ayuda de un pulverizador el “**REACTIVO 1**” (Bluestar® Forensic). Como resultado se divisan diferentes intensidades lumínicas en color azul

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

procedentes de los soportes de ambos grupos, esto se debe en algunos casos a la reacción lumínica de la actividad peroxidasa que posee la sangre humana entre otras sustancias. Ver las figuras adjuntas.



Figura 10. Preparación de los soportes pertenecientes al grupo "I" y "II", como así también el resultado obtenido luego de aplicar el reactivo del luminol Bluestar® Forensic.

Luego se apartan los soportes correspondientes al **grupo III** (toalla III, cerámica III, llave III y madera III), que se sometieron al "LAVADO 1" y los soportes que constituyen al **grupo IV** (toalla IV, cerámica IV, llave IV y madera IV), que fueron sometidos al "LAVADO 2", a los que se les aplicó en forma directa por aspersion con la ayuda de un pulverizador el "REACTIVO 2" (Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky). En consecuencia, se aprecian diversas intensidades lumínicas en color azul emitidas por los soportes de ambos grupos, esto se debe en algunos casos a la reacción lumínica de la actividad peroxidasa que posee la sangre humana entre otras sustancias. Ver las figuras adjuntas.



Figura 11. Preparación de los soportes pertenecientes al grupo "III" y "VI", como así también el resultado obtenido luego de aplicar el reactivo del luminol preparado mediante la fórmula de Grodsky

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 3.

Aplicación de los reactivos 1 y 2, sobre los soportes seleccionas con sus respectivos lavados

"REACTIVO 1" Luminol de marca BLUESTAR® FORENSIC		"REACTIVO 2" Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky	
LAVADO 1 (agua + detergente)	LAVADO 2 (agua + lavandina)	LAVADO 1 (agua + detergente)	LAVADO 2 (agua + lavandina)
GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
toalla I	toalla II	toalla III	toalla IV
cerámica I	cerámica II	cerámica III	cerámica IV
llave I	llave II	llave III	llave IV
madera I	madera II	madera III	madera IV

Cabe destacar que la luminiscencia producida por cada uno de los soportes fue registrada mediante fotografía con el objeto facilitar posteriormente el levantamiento de la muestra que serán utilizadas para la extracción de ADN. Para ello se dejaron secar por un término de 24 hs.

Levantamiento de muestras.

En esta parte se llevó a cabo el levantamiento de las posibles muestras que pudieran hallarse en aquellos soportes que en principio fueron sometidos a el "**LAVADO 1**" o al "**LAVADO 2**", a los que posteriormente se les aplico el reactivo luminol. Estas fueron utilizadas con la finalidad de extraer muestra de ADN.

Existen diversas técnicas de levantamientos de muestra, sin embargo, para este trabajo se consideraron dos técnicas en base a la superficie de los soportes involucrados, por un lado se eligió la técnica de sustracción, la cual consiste en extraer una pequeña porción de material constitutivo del soporte para ser analizado con posterioridad; y por otro lado la técnica de transferencia, cuyo objeto es transferir la sustancia hallada sobre una superficie determinada a otra mediante la implementación de un elemento absorbente, en este caso se utilizó un hisopo con torunda de algodón el cual fue embebido en un solvente adecuado (agua destilada), con el objeto de humedecer el hisopo para luego aplicarlo en la superficie deseada y mediante un suave frotis permitir la transferencia de material biológico de un soporte a otro. Seguidamente se detalla la metodología empleada para el levantamiento de muestra de cada soporte involucrado.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Se inició con el levantamiento de las posibles muestras correspondientes a los soportes del **grupo I** (toalla I, cerámica I, llave I y madera I), estos fueron sometidos al **LAVADO 1** (agua + detergente) y a los que posteriormente se les aplicó el **“REACTIVO 1”** (Bluestar® Forensic).

Atento a esto es que se aplicó la técnica de sustracción para soporte de toalla de color claro, obteniéndose una pequeña muestra con ayuda de una tijera y pinza quirúrgica estériles, siendo identificada como **“TOALLA I”** (fragmento de tela); mientras que en el resto de los soportes se realizó por cada uno el levantamiento de posible muestra mediante un hisopado embebido en solvente adecuado, tal como agua destilada, de este modo se obtuvieron tres muestras, identificándolas como **“CERÁMICA I”**, **“LLAVE I”** y **“MADERA I”**. ver tabla adjunta.

Tabla 4.

Representación de la técnica aplicada y de la muestra obtenida de los soportes pertenecientes al grupo I.

"REACTIVO 1" BLUESTAR® FORENSIC			
LAVADO 1 (agua + detergente)			
SOPORTES DEL GRUPO I	TÉCNICA DE LEVANTAMIENTO	MUESTRAS OBTENIDAS	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS
toalla I	sustracción	fragmento de tela	"TOALLA I"
cerámica I	transferencia	hisopo	"CERÁMICA I"
llave I	transferencia	hisopo	"LLAVE I"
madera I	transferencia	hisopo	"MADERA I"

Luego se realizó la extracción de las muestras correspondientes a los soportes del **grupo II** (toalla II, cerámica II, llave II y madera II), los cuales fueron expuestas al **LAVADO 2** (agua + lavandina) y posteriormente se les aplicó el **“REACTIVO 1”** (Bluestar® Forensic).

De igual modo que en el párrafo anterior se utilizó la técnica de sustracción del soporte de toalla de color claro, obteniéndose una pequeña muestra con ayuda de una tijera y pinza quirúrgica, siendo identificada como **“TOALLA II”**; mientras que en el resto de los soportes (cerámica II, llave II y madera II) se realizó por cada uno, el levantamiento de posible muestra mediante hisopado embebido en solvente adecuado, de tal modo se obtiene la totalidad de tres muestras, procediendo a identificar como **“CERÁMICA II”**, **“LLAVE II”** y **“MADERA II”**. ver tabla adjunta.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 5.

Representación de la técnica aplicada y de la muestra obtenida de los soportes pertenecientes al grupo II.

"REACTIVO 1" BLUESTAR® FORENSIC			
LAVADO 2 (agua + lavandina)			
SOPORTES DEL GRUPO II	TÉCNICA DE LEVANTAMIENTO	MUESTRAS OBTENIDAS	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS
toalla II	sustracción	fragmento de tela	"TOALLA II"
cerámica II	transferencia	hisopo	"CERÁMICA II"
llave II	transferencia	hisopo	"LLAVE II"
madera II	transferencia	hisopo	"MADERA II"

Seguidamente se continuó con el levantamiento de las muestras correspondientes a los soportes del **grupo III** (toalla III, cerámica III, llave III y madera III), estos fueron expuestos al **LAVADO 1** (agua + detergente), y se prosiguió con la aplicación del **"REACTIVO 2"** (Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky).

Al igual que antes se utilizó la técnica de sustracción del soporte de toalla de color claro, obteniéndose una pequeña muestra con ayuda de una tijera y pinza quirúrgica, siendo identificada como "TOALLA III"; mientras que en el resto de los soportes (cerámica, llave y madera) se realizó por cada uno la técnica de transferencia mediante hisopado embebido en solvente, de tal modo se obtiene la totalidad de tres muestras, procediendo a identificar como "CERÁMICA III", "LLAVE III" y "MADERA III". ver tabla adjunta.

Tabla 6.

Representación de la técnica aplicada y de la muestra obtenida de los soportes pertenecientes al grupo III.

"REACTIVO 2" Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky			
LAVADO 1 (agua + detergente)			
SOPORTES DEL GRUPO III	TÉCNICA DE LEVANTAMIENTO	MUESTRAS OBTENIDAS	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS
toalla III	sustracción	fragmento de tela	"TOALLA III"
cerámica III	transferencia	hisopo	"CERÁMICA III"
llave III	transferencia	hisopo	"LLAVE III"
madera III	transferencia	hisopo	"MADERA III"

Por último, se finaliza con el levantamiento de muestras correspondientes a los soportes del **grupo IV** (toalla IV, cerámica IV, llave IV y madera IV), los cuales fueron

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

sometidos al **LAVADO 2** (agua + lavandina), y luego se les roció el **“REACTIVO 2”** (Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky).

Procediéndose a realizar técnica de sustracción del soporte de toalla de color claro, obteniéndose una pequeña muestra con ayuda de una tijera y pinza quirúrgica, siendo identificada como **“TOALLA IV”**; mientras que en el resto de los soportes (cerámica, llave y madera) se realizó por cada uno la técnica de transferencia mediante hisopado embebido en solvente, de tal modo se obtiene la totalidad de tres muestras, procediendo a identificar como **“CERÁMICA IV”**, **“LLAVE IV”** y **“MADERA IV”**. ver tabla adjunta.

Tabla 7.

Representación de la técnica aplicada y de la muestra obtenida de los soportes pertenecientes al grupo IV.

"REACTIVO 2" Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky			
LAVADO 2 (agua + lavandina)			
SOPORTES DEL GRUPO IV	TÉCNICA DE LEVANTAMIENTO	MUESTRAS OBTENIDAS	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS
toalla IV	sustracción	fragmento de tela	"TOALLA IV"
cerámica IV	transferencia	hisopo	"CERÁMICA IV"
llave IV	transferencia	hisopo	"LLAVE IV"
madera IV	transferencia	hisopo	"MADERA IV"

Finalmente habiéndose terminado con los levantamientos pertinentes, se obtuvieron las siguientes muestras: CUATRO (04) fragmentos de tela, cada uno extraído del soporte de toalla correspondiente a cada grupo, a los cuales se los rotulo como **“TOALLA (I, II, III y IV)”** y DOCE (12) hisopos que se obtuvieron por transferencia de los soportes de cerámica, llave y madera de los grupos I, II, III y IV.

Tabla 8.

Representación de la totalidad de las muestras obtenidas para extracción de ADN

SOPORTE INICIAL	SOPORTE FINAL	IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS			
		GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
toalla	toalla	toalla I	toalla II	toalla III	toalla IV
cerámica	hisopo	cerámica I	cerámica II	cerámica III	cerámica IV
llave	hisopo	llave I	llave II	llave III	llave IV
madera	hisopo	madera I	madera II	madera III	madera IV

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

A continuación, se procedió a preparar las muestras obtenidas recientemente para la siguiente etapa. Como se puede notar en la tabla expuesta, para las muestras recolectadas de los soportes de cerámica, llave y madera de los cuatro grupos, se encuentran en un soporte nuevo (hisopo) y al igual que con los fragmentos de tela, se debe esencialmente extraer una porción de muestra de cada uno, con la finalidad de procesarlas.

Es importante aclarar que las DIECISEIS (16) muestras extraídas, de las telas como de los hisopos, fueron preparadas para la siguiente etapa y para ello se colocaron por separado en el interior de tubos plástico tipo eppendorf de 1,5 ml con tapa a presión, para mayor protección, los cuales fueron debidamente identificados.

Técnicas de biología molecular utilizadas para la obtención de los perfiles genéticos.

A continuación, se detallan las metodologías aplicadas, (Extracción de ADN, Cuantificación de ADN, Amplificación de ADN y Obtención de Perfil Genético), para la tipificación de ADN, utilizando los protocolos específicos del lugar de trabajo.

Se realizó la tipificación de ADN de cada una de las muestras extraídas anteriormente de los soportes involucrados y de la muestra de referencia obtenida del voluntario masculino, con el objeto de analizar los posibles perfiles genéticos y verificar la condición de cada uno, es decir si están o no completos.

Extracción de ADN celular.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit PrepFiler express™ (Thermo Fisher Scientific) en el equipo automatizado, AutoMate Express™ (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, detallándose brevemente a continuación los protocolos utilizados:

La extracción del ADN se realizó a partir de las DIECISEIS (16) muestras tomadas tanto de las telas/toallas e hisopos, a las cuales se las identifico como **“TOALLA I”**, **“TOALLA II”**, **“TOALLA III”** y **“TOALLA IV”**; **“CERÁMICA I”**, **“CERÁMICA II”**, **“CERÁMICA III”** y **“CERÁMICA IV”**; **“LLAVE I”**, **“LLAVE II”**,

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

“LLAVE III” y “LLAVE IV”; “MADERA I”, “MADERA II”, “MADERA III” y “MADERA IV” y un blanco de extracción por corrida.

El lisado de cada una de las muestras se realizó dentro de la columna de extracción (*LySep*) acoplada a un tubo de lisis, con 5 μ l de DTT (Dithiothreitol) y 500 μ l de *buffer* de lisado y se incubaron a 70°C y 750 rpm durante 40 minutos en bloque térmico con agitación. Luego, se realizó el pasaje de la totalidad de la muestra de la columna de extracción al tubo de muestra mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se realizó la carga del instrumento, para la extracción del ADN. Brevemente, se colocaron los cartuchos con los reactivos de extracción en el rack correspondiente; el lisado de las muestras, los *tips holders* y los tubos de elución, se colocaron en las posiciones “S”, “T2” y “E” del rack de tubos y *tips*, respectivamente.

Seguidamente se programó el protocolo del AutoMate Express™ para la correspondiente extracción en un volumen de elución de 40 μ l por muestra, el cual perduro por 30 min. Finalmente, las muestras de ADN extraídas se refrigeraron a -20°C hasta su cuantificación mediante *Real Time* PCR. Ver figuras adjuntas.

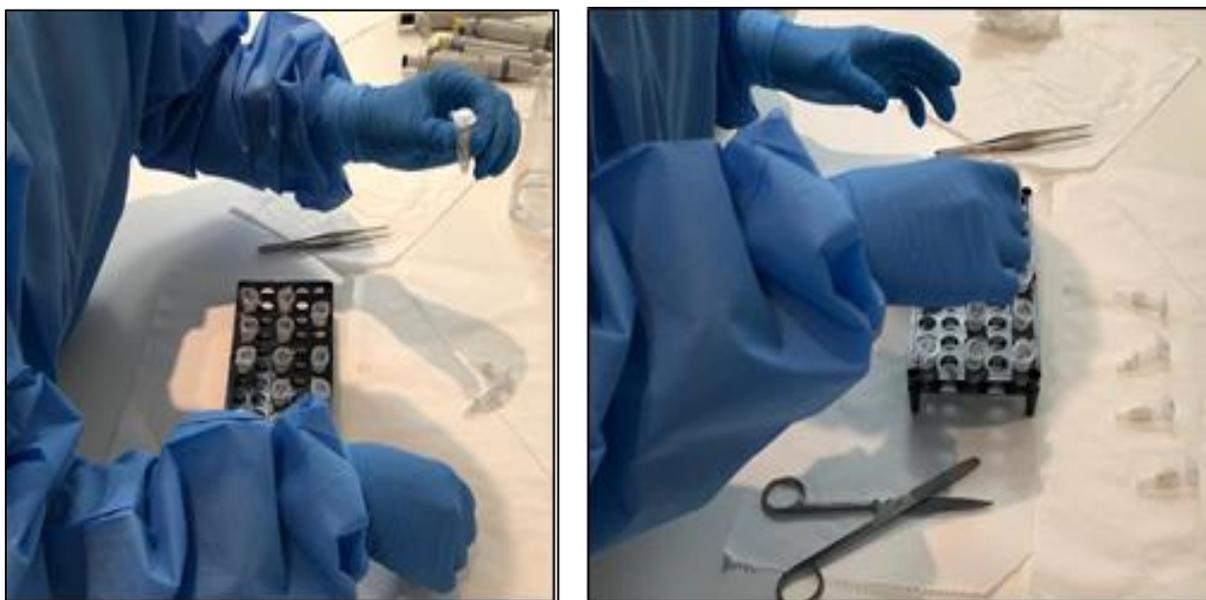


Figura 12. Preparación de las muestras para su posterior extracción de ADN

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Cuantificación de ADN.

La cuantificación de ADN se realizó mediante *Real Time* PCR con el Kit Quantifiler Trio DNA Quantification de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific), usando el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500. En síntesis, en este procedimiento se amplifica y cuantifica ADN autosómico (fragmento corto y fragmento largo) y de cromosoma-Y, como así también un control interno de amplificación, por medio de sondas y *primers* específicos para cada fragmento blanco, lo que determina que sea un método muy sensible para arribar a la cantidad de ADN presente en la muestra con gran certeza.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de ADN se analizaron con el Software HID Real-Time PCR Análisis v1.2 precargado en el equipo.

A continuación, se detallan brevemente los cinco pasos realizados en la presente etapa:

1. Preparación de la curva standard.

La curva Standard se compone de cinco puntos a partir de diluciones seriadas del Standard del Kit Quantifiler Trio DNA Quantification™. En resumen, se comenzó rotulando cinco tubos de microcentrífuga de 1,5 ml como “S1”, “S2”, “S3”, “S4” y “S5”; luego en el tubo “S1” se dispensaron 10 µl de buffer de dilución, mientras que en el resto de los tubos se colocaron 90 µl del mismo, seguidamente se agregaron 10 µl del Standard de ADN al tubo “S1” se homogenizó la solución resultante con el Standard y el buffer. A partir de esa solución se realizaron las diluciones seriadas, para ello que del tubo “S1” se tomaron 10 µl de solución y se colocaron en el tubo “S2” el cual poseía los 90 µl del buffer de dilución, luego de este tubo se toman 10 µl y se colocan en el tubo “S3”, así se continuo hasta el tubo “S5”, para mayor claridad se adjunta la tabla 9 y figura 13.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 9.
Representación de las concentraciones de la Curva Standard.

Standard	Concentración (ng/μl)	Cantidades	Factor de dilución
S1	50	10 μl (100 ng/μl stock) + 10 μl buffer de dilución	2X
S2	5	10 μl de "S1" + 90 μl buffer de dilución	10X
S3	0,5	10 μl de "S2" + 90 μl buffer de dilución	10X
S4	0,05	10 μl de "S3" + 90 μl buffer de dilución	10X
S5	0,005	10 μl de "S4" + 90 μl buffer de dilución	10X

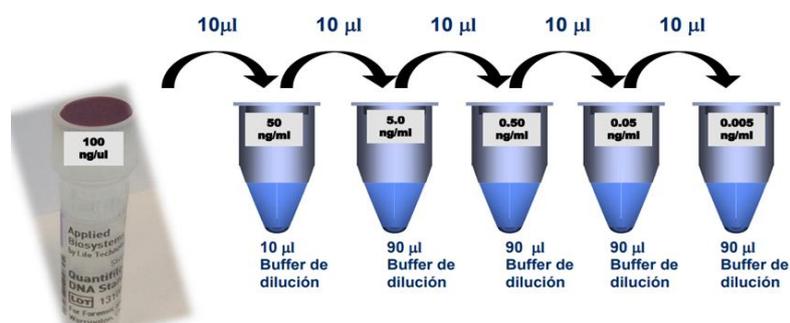


Figura 13. Esquema de las diluciones seriadas. Extraída de la empresa Applied Biosystems.

2. Preparación de la master mix.

En este paso, se determinó el número de muestras, controles y standard que van a ser cuantificadas, con ello se calculó y se preparó la Master Mix, para cada muestra se utilizaron 8 μl de Quantifiler Trio Primer Mix y 10 μl de Quantifiler Trio PCR Reacción Mix. En el cálculo total se encuentra contemplado un excedente del 10% correspondiente al error esperado, como resultado se obtuvo un volumen final de 540 μl de Master Mix, destacando que la preparación de esta reacción se llevó a cabo dentro de una cabina UV. En todo el proceso se tuvo el recaudo de proteger los reactivos de la luz artificial.

3. Preparación de muestras.

Esta preparación radicó en dispensar 18 μl Master mix en las primeras cuatro columnas (preparada en el párrafo anterior) de una placa de 96 pocillos de plástico transparente de calidad óptima para biología molecular, tal como se detalla en la tabla 10. Todo ello realizado bajo cabina UV, para proteger la calidad de los reactivos.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Luego a cada uno de los pocillos donde se dispensó Master Mix se agregó por separado 2 μ l de Standars, 2 μ l de muestras y 2 μ l del control negativo (CN), destacando que el standard se realizó por duplicado y que para el control negativo se utilizó el buffer de dilución del Standard de ADN. Por último, se cubrió la placa de reacción con un film transparente de calidad óptica y se colocó en el interior del equipo ABI 7500.

Tabla 10.
Representación de la placa de reacción.

	1	2	3	4
A	S1	S1*	LLAVE I	CERAMICA I
B	S2	S2*	LLAVE II	CARAMICA II
C	S3	S3*	LLAVEIII	CARAMICA III
D	S4	S4*	LLAVE IV	CERAMICA IV
E	S5	S5*	MADERA I	TELA I
F			MADERA II	TELA II
G			MADERA III	TELA III
H	CN		MADERA IV	TELA IV

4. Configuración de corrida.

La reacción de PCR se realizó en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Instrumento con el Software HID Real-Time PCR Análisis v1.2 precargado con el programa Quantifiler Trio. El protocolo de amplificación utilizado se muestra en la figura.

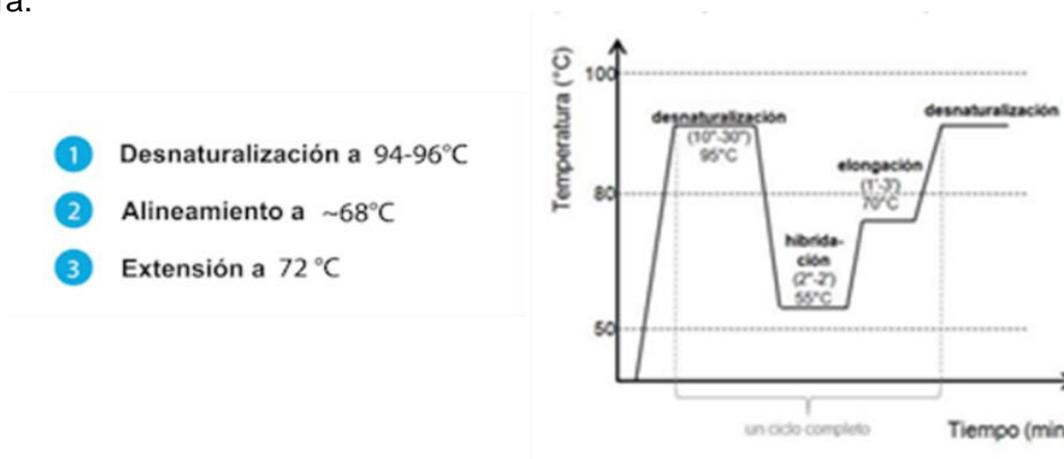


Figura 14. Condiciones de ciclado para la amplificación del Kit QuantiFiler Trio.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

5. Análisis de resultados.

Finalizado con el proceso de cuantificación bajo el método mencionado anteriormente, se pudo establecer cantidad de ADN que tienen las muestras involucradas para ser amplificada, estimando la concentración de cada una de ellas respecto a las muestras de concentración conocida (curva Standar). Ver las tablas 11 y 12, estas expresan los valores totales de cuantificación.

Para la cuantificación del ADN autosómico se tiene en cuenta el valor correspondiente a fragmento autosómico corto (Target Small Autosomal), para la cuantificación del material genético masculino se tiene en cuenta el valor expresado como target Y.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 11.
Valores obtenidos de las muestras standard.

Posición	Nombre de Muestra	Nombre Target	Cantidad (ng/μl)
A1	Trio Standard 1	T.IPC	
A1	Trio Standard 1	T. Large Autosomal	50
A1	Trio Standard 1	T. Small Autosomal	50
A1	Trio Standard 1	T. Y	50
A2	Trio Standard 1`	T.IPC	
A2	Trio Standard 1`	T. Large Autosomal	50
A2	Trio Standard 1`	T. Small Autosomal	50
A2	Trio Standard 1`	T. Y	50
B1	Trio Standard 2	T.IPC	
B1	Trio Standard 2	T. Large Autosomal	5
B1	Trio Standard 2	T. Small Autosomal	5
B1	Trio Standard 2	T. Y	5
B2	Trio Standard 2`	T.IPC	
B2	Trio Standard 2`	T. Large Autosomal	5
B2	Trio Standard 2`	T. Small Autosomal	5
B2	Trio Standard 2`	T. Y	5
C1	Trio Standard 3	T.IPC	
C1	Trio Standard 3	T. Large Autosomal	0,5
C1	Trio Standard 3	T. Small Autosomal	0,5
C1	Trio Standard 3	T. Y	0,5
C2	Trio Standard 3`	T.IPC	
C2	Trio Standard 3`	T. Large Autosomal	0,5
C2	Trio Standard 3`	T. Small Autosomal	0,5
C2	Trio Standard 3`	T. Y	0,5
D1	Trio Standard 4	T.IPC	
D1	Trio Standard 4	T. Large Autosomal	0,050000001
D1	Trio Standard 4	T. Small Autosomal	0,050000001
D1	Trio Standard 4	T. Y	0,050000001
D2	Trio Standard 4`	T.IPC	
D2	Trio Standard 4`	T. Large Autosomal	0,050000001
D2	Trio Standard 4`	T. Small Autosomal	0,050000001
D2	Trio Standard 4`	T. Y	0,050000001
E1	Trio Standard 5	T.IPC	
E1	Trio Standard 5	T. Large Autosomal	0,005
E1	Trio Standard 5	T. Small Autosomal	0,005
E1	Trio Standard 5	T. Y	0,005
E2	Trio Standard 5`	T.IPC	
E2	Trio Standard 5`	T. Large Autosomal	0,005
E2	Trio Standard 5`	T. Small Autosomal	0,005
E2	Trio Standard 5`	T. Y	0,005

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 12.
Valores obtenidos de las muestras analizadas.

Posición	Nombre de Muestra	Nombre Target	Cantidad (ng/μl)
E3	MADERA I	T. IPC	
E3	MADERA I	T. Large Autosomal	0,073260136
E3	MADERA I	T. Small Autosomal	0,097406946
E3	MADERA I	T. Y	0,062016521
E4	TELA I	T. IPC	
E4	TELA I	T. Large Autosomal	3,214297056
E4	TELA I	T. Small Autosomal	2,478929281
E4	TELA I	T. Y	2,253030062
A3	LLAVE I	T. IPC	
A3	LLAVE I	T. Large Autosomal	0,158718184
A3	LLAVE I	T. Small Autosomal	0,09134727
A3	LLAVE I	T. Y	0,084219441
A4	CERAMICA I	T. IPC	
A4	CERAMICA I	T. Large Autosomal	0,111484379
A4	CERAMICA I	T. Small Autosomal	0,075497501
A4	CERAMICA I	T. Y	0,064015232
F3	MADERA II	T. IPC	
F3	MADERA II	T. Large Autosomal	0,004928879
F3	MADERA II	T. Small Autosomal	0,010143855
F3	MADERA II	T. Y	0,004424804
F4	TELA II	T. IPC	
F4	TELA II	T. Large Autosomal	0,458446115
F4	TELA II	T. Small Autosomal	0,708462954
F4	TELA II	T. Y	0,454367459
B3	LLAVE II	T. IPC	
B3	LLAVE II	T. Large Autosomal	0,002253157
B3	LLAVE II	T. Small Autosomal	0,003945282
B3	LLAVE II	T. Y	0,002722375
B4	CERAMICA II	T. IPC	
B4	CERAMICA II	T. Large Autosomal	0,000745558
B4	CERAMICA II	T. Small Autosomal	0,001248084
B4	CERAMICA II	T. Y	0,000586054
C3	LLAVE III	T. IPC	
C3	LLAVE III	T. Large Autosomal	0,008240796
C3	LLAVE III	T. Small Autosomal	0,009113068
C3	LLAVE III	T. Y	0,007122734
C4	CERAMICA III	T. IPC	
C4	CERAMICA III	T. Large Autosomal	2,345084906
C4	CERAMICA III	T. Small Autosomal	1,689313173
C4	CERAMICA III	T. Y	1,507582903

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 13.
Valores obtenidos de las muestras analizadas.

Posición	Nombre de Muestra	Nombre Target	Cantidad (ng/μl)
G3	MADERA III	T. IPC	
G3	MADERA III	T. Large Autosomal	0,064274959
G3	MADERA III	T. Small Autosomal	0,059894826
G3	MADERA III	T. Y	0,044798668
G4	TELA III	T. IPC	
G4	TELA III	T. Large Autosomal	0,468397915
G4	TELA III	T. Small Autosomal	0,377008766
G4	TELA III	T. Y	0,320542127
H3	MADERA IV	T. IPC	
H3	MADERA IV	T. Large Autosomal	0,006534807
H3	MADERA IV	T. Small Autosomal	0,010361542
H3	MADERA IV	T. Y	0,006588661
H4	TELA IV	T. IPC	
H4	TELA IV	T. Large Autosomal	0,998521924
H4	TELA IV	T. Small Autosomal	1,159890175
H4	TELA IV	T. Y	0,936363816
D3	LLAVE IV	T. IPC	
D3	LLAVE IV	T. Large Autosomal	0,404490471
D3	LLAVE IV	T. Small Autosomal	0,28238374
D3	LLAVE IV	T. Y	0,240206122
D4	CERAMICA IV	T. IPC	
D4	CERAMICA IV	T. Large Autosomal	0,207738981
D4	CERAMICA IV	T. Small Autosomal	0,163929522
D4	CERAMICA IV	T. Y	0,139100403
H1	BCO I	T. IPC	
H1	BCO I	T. Large Autosomal	
H1	BCO I	T. Small Autosomal	
H1	BCO I	T. Y	
H2	BCO II	T. IPC	
H2	BCO II	T. Large Autosomal	
H2	BCO II	T. Small Autosomal	
H2	BCO II	T. Y	

Es importante mencionar que la concentración de ADN por convención es de 0,5 a 2 ng/μl. Sin embargo, las reacciones de PCR requieren el valor medio más recomendado en la comunidad científica de 1 ng de ADN, siendo este equivalente a unas 303 copias del genoma humano para obtener un perfil genético de buena calidad. (Márquez C et. al. 2020). De acuerdo a la puesta a punto del laboratorio, se utilizaron

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

0,75 ng de ADN por μl para la amplificación de STRs autosómicos y 2 ng/ μl para la amplificación de Y-STRs.

Por otra parte, en cuanto a las muestras que no lograron la concentración mínima de ADN, tal como las identificadas como “LLAVE II”; “LLAVE III”, “CÉRAMICA II”, “MADERA II” y “MADERA IV”, fueron recuantificadas, para descartar que haya sido un problema de la corrida.

Tabla 14.
Esquema de la Re- cuantificación de las muestras.

PLACA DE RE CUANTIFICACIÓN		
	1	2
A	S1	S1*
B	S2	S2*
C	S3	S3*
D	S4	S4*
E	S5	S5*
F	LLAVE II	LLAVE III
G	CERAMICA II	MADERA IV
H	MEDERA II	

Análisis de los resultados de la cuantificación.

Resultados de la Recuantificación realizada sobre las muestras de baja concentración de ADN. Ver tabla 14, la misma expresa los valores totales de cuantificación.

Tabla 15.
Valores obtenidos de las muestras standard (parte 1/2) y de las muestras analizadas.

Posición	Nombre de Muestra	Nombre Target	Cantidad (ng/ μl)
A1	Trio Standard 1	T. IPC	
A1	Trio Standard 1	T. Large Autosomal	50
A1	Trio Standard 1	T. Small Autosomal	50
A1	Trio Standard 1	T. Y	50
A2	Trio Standard 1´	T. IPC	
A2	Trio Standard 1´	T. Large Autosomal	50
A2	Trio Standard 1´	T. Small Autosomal	50
A2	Trio Standard 1´	T. Y	50

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 16.

Valores obtenidos de las muestras standard (parte 2/2) y de las muestras analizadas.

Posición	Nombre de Muestra	Nombre Target	Cantidad (ng/μl)
B1	Trio Standard 2	T. IPC	
B1	Trio Standard 2	T. Large Autosomal	5
B1	Trio Standard 2	T. Small Autosomal	5
B1	Trio Standard 2	T. Y	5
B2	Trio Standard 2'	T. IPC	
B2	Trio Standard 2'	T. Large Autosomal	5
B2	Trio Standard 2'	T. Small Autosomal	5
B2	Trio Standard 2'	T. Y	5
C1	Trio Standard 3	T. IPC	
C1	Trio Standard 3	T. Large Autosomal	0,5
C1	Trio Standard 3	T. Small Autosomal	0,5
C1	Trio Standard 3	T. Y	0,5
C2	Trio Standard 3'	T. IPC	
C2	Trio Standard 3'	T. Large Autosomal	0,5
C2	Trio Standard 3'	T. Small Autosomal	0,5
C2	Trio Standard 3'	T. Y	0,5
D1	Trio Standard 4	T. IPC	
D1	Trio Standard 4	T. Large Autosomal	0,050000001
D1	Trio Standard 4	T. Small Autosomal	0,050000001
D1	Trio Standard 4	T. Y	0,050000001
D2	Trio Standard 4'	T. IPC	
D2	Trio Standard 4'	T. Large Autosomal	0,050000001
D2	Trio Standard 4'	T. Small Autosomal	0,050000001
D2	Trio Standard 4'	T. Y	0,050000001
E1	Trio Standard 5	T. IPC	
E1	Trio Standard 5	T. Large Autosomal	0,005
E1	Trio Standard 5	T. Small Autosomal	0,005
E1	Trio Standard 5	T. Y	0,005
E2	Trio Standard 5'	T. IPC	
E2	Trio Standard 5'	T. Large Autosomal	0,005
E2	Trio Standard 5'	T. Small Autosomal	0,005
E2	Trio Standard 5'	T. Y	0,005
G1	CERAMICA II	T. IPC	
G1	CERAMICA II	T. Large Autosomal	0,000202722
G1	CERAMICA II	T. Small Autosomal	0,00043945
G1	CERAMICA II	T. Y	0,000883418
G2	MADERA IV	T. IPC	
G2	MADERA IV	T. Large Autosomal	0,005019925
G2	MADERA IV	T. Small Autosomal	0,006927342
G2	MADERA IV	T. Y	0,009571456
H1	MADERA II	T. IPC	
H1	MADERA II	T. Large Autosomal	0,00365931
H1	MADERA II	T. Small Autosomal	0,005980502
H1	MADERA II	T. Y	0,00596485

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Las muestras que luego de la recuantificación no superaron la cantidad mínima requerida de ADN, fueron excluidas de la amplificación.

Amplificación de ADN.

En esta etapa se emplea el método PCR punto final usando el equipo Veriti^R Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). En esta etapa se amplificaron por un lado STRs autosómicos con el kit comercial GlobalFiler Plus (Thermo Fisher Scientific-Applied Biosystems) y además STRs de Cromosoma Y utilizando el Kit Yfiler Plus (Thermo Fisher Scientific-Applied Biosystems). Lo que se intenta lograr en esta etapa es amplificar regiones de interés generando millones de copias de estas secuencias, para luego evidenciarlas mediante electroforesis capilar.

Amplificación de ADN autosómico.

En base a las concentraciones de ADN (STRs autosómicos), obtenidas en la cuantificación, se procedió a la preparación de las muestras para la etapa de amplificación, para ello se realizó una dilución (D1) en dada una de las muestras para llevar su cuantificación a 0,75 ng/ μ l, ver tabla adjunta.

Tabla 17.
Representación de las diluciones realizadas. (SD sin diluir).

DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS CUANTIFICADAS			
Identificación de muestras	concentración ADN ng/ μ l	Volumen (μ l) de ADN para D1	Volumen (μ l) de Diluyente (D1)
CERAMICA I	0.0755	SD	
CERAMICA II	0.0013		
CERAMICA III	16.893	2.0	18.0
CERAMICA IV	0.1639	13.8	16.2
LLAVE I	0.0913	24.64	5.36
LLAVE II	0.0039		
LLAVE III	0.0091		
LLAVE IV	0.2824	9.4	5.6
MADERA I	0.0974	23.2	6.8
MADERA II	0.0102		
MADERA III	0.0599	SD	
MADERA IV	0.0104		
TELA I	24.789	1.0	14.0
TELA II	0.7085	5.0	15.0
TELA III	0.3770	7.0	8.0
TELA IV	11.599	2.4	12.6

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Seguidamente se calculó y se preparó el producto de amplificación para las muestras cuantificadas previamente, el control positivo y control negativo. Comenzando con la preparación de Master Mix por lo que se calculó 7,5 µl de PCR Reacción Mix y 2,5 µl de Primer Set, obteniéndose el volumen final de 150 µl de Master Mix con un excedente del 10 % correspondiente al error esperado, cabe destacar que la solución se llevó a cabo dentro de una cabina UV, con el objeto de proteger la calidad de los reactivos.

Luego se preparó una placa de amplificación correctamente identificada y se vertieron 10 µl de Master Mix en los correspondientes pocillos y se le agregó 5 µl de las diferentes diluciones logradas de la cuantificación. Por último, se tapó la placa de reacción y se colocó en el interior del equipo Veriti^R Thermal Cycler. Se adjunta la placa de amplificación.

Tabla 18.
Esquema representativo de la placa de amplificación.

PLACA DE AMPLIFICACIÓN		
	1	2
A	LLAVE I	LLAVE IV
B	TELA II	CERAMICA IV
C	CERAMICA I	TALE IV
D	CARAMICA III	CN-AMP
E	MADERA I	CP-AMP
F	MADERA III	
G	TELA I	
H	TELA III	

El protocolo de amplificación por PCR consistió en 25-30 ciclos, produciendo por cada ciclo los tres pasos que se detallan: 1)- desnaturalización, por calor se desnaturalizan (separan) las cadenas de ADN; 2)- alineamiento de los iniciadores o primers que se unen por complementariedad de bases y delimitan las regiones que se van a amplificar, y 3)- extensión, en cada ciclo de PCR se duplica la secuencia blanco (STRs), por lo que en 25 a 30 ciclos teóricamente habrá millones de copias, facilitando su análisis, para mayor entendimiento se adjunta la siguiente tabla.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 19.

Esquema de los ciclos de PCR punto final. Extraída del protocolo con el Kit Globalfiler

PROTOCOLO POR VEINTINUEVE CICLOS				
Incubación Inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Final
95° C	94°C	59°C	60 ° C	4° C
1 min.	10 seg.	90 seg.	10 min.	∞

Amplificación de ADN de Cromosoma Y.

En base a las concentraciones de ADN (STRs de cromosoma Y), se regularizaron las muestras para llevar de 0,15 ng/ µl de concentración de acuerdo a los resultados de la cuantificación. Para ello se realizaron las siguientes diluciones (D1) para mayor claridad ver tabla adjunta.

Tabla 20.

Representación de las diluciones realizadas. (SD sin diluir)

DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS CUANTIFICADAS			
Identificación de muestras	concentración ADN ng/µl	Volumen (µl) de ADN para D1	Volumen (µl) de Diluyente (D1)
CERAMICA I	0,064	SD	
CERAMICA III	1,5076	2.0	18.0
CERAMICA IV	0,1391	SD	16.2
LLAVE I	0,0842	SD	
LLAVE IV	0,2402	9.4	5.6
MADERA I	0,062	SD	6.8
MADERA III	0,0448	SD	
TELA I	2,253	1.0	14.0
TELA II	0,4544	5.0	10.0
TELA III	0,3205	7.0	8.0
TELA IV	0,9363	2.4	12.6

Seguidamente se calculó y se preparó el producto de amplificación las muestras cuantificadas previamente, el control positivo y control negativo. Comenzando con la preparación de Master Mix por lo que se calculó 5 µl de PCR Reacción Mix y 2,5 µl de Primer Set, obteniéndose el volumen final de 113 µl de Master Mix, cabe destacar que la solución se llevó a cabo dentro de una cabina UV, con el objeto de proteger la calidad de los reactivos.

Luego se preparó una placa de amplificación correctamente identificación y se vertió 7,5 µl de Master Mix en los correspondientes pocillos y se le agrego 5 µl de las

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

diferentes diluciones logradas de la cuantificación. Por último, se tapó la placa de reacción y se colocó en el interior del equipo Veriti^R Thermal Cyclor. Se adjunta la placa de amplificación.

Tabla 21.

Esquema representativo de la placa de amplificación STRs de Cromosoma Y.

PLACA DE AMPLIFICACIÓN YFP		
	1	2
A	LLAVE I	LLAVE IV
B	TELA II	CERAMICA IV
C	CERAMICA I	TALE IV
D	CARAMICA III	CN-AMP
E	MADERA I	CP-AMP
F	MADERA III	
G	TELA I	
H	TELA III	

El protocolo de amplificación por PCR consistió en 25-30 ciclos, produciendo por cada ciclo los tres pasos que se detallan: 1)- desnaturalización, por calor se desnaturalizan (separan) las cadenas de ADN; 2)- alineamiento de los iniciadores o primers que se unen por complementariedad de bases y delimitan las regiones que se van a amplificar, y 3)- extensión, en cada ciclo de PCR se duplica la secuencia blanco (STRs), por lo que en 25 a 30 ciclos teóricamente habrá millones de copias, facilitando su análisis, para mayor entendimiento se adjunta la siguiente tabla.

Tabla 22.

Esquema de los ciclos de PCR punto final. Extraída del protocolo de Kit Yfiler Plus.

PROTOCOLO POR VEINTINUEVE CICLOS				
Incubación Inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Final
95° C	94°C	61.5°C	60 ° C	4° C
1 min.	4 seg.	1 min.	22 min.	∞

tención de perfiles genéticos.

Se llevó a cabo por el método de Electroforesis Capilar y se analizó en el secuenciador automático ABI 3500 de ocho capilares (Thermo Fisher Scientific-Applied Biosystems). Este método consiste en separar en forma rápida y precisa el producto amplificado, generando un electroferograma (representación gráfica de la corrida).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Obtención de perfil genético STRs autosómicos.

En esta fase se continuó con la separación electroforética de las muestras amplificadas STRs autosómicos, a las cuales se las acondicionó previamente. Antes de ser colocadas en el equipo se preparó la Master Mix, compuesta por el marcador de peso molecular *GeneScan™ 600-LIZ® size estándar* (que permite reconocer el tamaño del fragmento STR) y la *Hi-Di* Formamida. Por lo tanto, se calcularon los siguiente volúmenes 0,5 µl del Standard y 8,5 µl de formamida, para trece (13) muestras, obteniéndose el volumen final de 135 µl de Master Mix con un excedente del 10 % correspondiente al error esperado.

Seguidamente se sembró placa de 96 pocillos de acuerdo con la tabla 13 colocándose en los pasillos correspondientes 9 µl de Master Mix y posteriormente se le agrego 1 µl de las muestras de ADN amplificado. Por último, se agregó la escalera alélica, la cual contiene una mezcla de todos los alelos de cada STR, luego se cubrió la placa de amplificación con septas de goma y se desnaturalizo en el equipo Veriti^R Thermal Cyclor de acuerdo con el protocolo vigente. Posteriormente se realizó un *spin* para que el líquido que podría estar adherido a las paredes del pocillo, como así también a la parte interna de la septa de goma descendan.

Finalmente se colocó la placa dentro del analizador genético ABI 3500 de ocho capilares (Thermo Fisher Scientific-Applied Biosystems), donde se realizó la electroforesis capilar. Los datos de la corrida se almacenan en el programa de análisis “*data collection*” en forma automatizada de cada una de las muestras.

Obtención de perfil genético STRs DE Cromosoma Y.

Al igual que en el paso anterior, en este caso se prepararon las muestras que fueron amplificadas STRs cromosoma Y, las cuales también fueron acondicionadas, por lo que se continuo con la preparación de la Master Mix, compuesta por el marcador de peso molecular *GeneScan™ 600-LIZ® size estándar* (que permite reconocer el tamaño del fragmento STRs de cromosoma Y) y la *Hi-Di* Formamida. Por lo tanto, se calcularon los siguiente volúmenes 0,5 µl del Standard y 8,5 µl de formamida, para trece 13 muestras, obteniéndose el volumen final de 135 µl de Master Mix con un excedente del 10 % correspondiente al error esperado.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Seguidamente se sembró placa de 96 pocillos de acuerdo a la tabla 13 colocándose en los pasillos correspondientes 9 µl de Master Mix y posteriormente se le agrego 1 µl de las muestras de ADN amplificado. Por último, se agregó la escalera alélica, la cual contiene una mezcla de todos los alelos de cada STR, luego se cubrió la placa de amplificación con septas de goma y se desnaturalizo en el equipo Veriti^R Thermal Cyclor de acuerdo al protocolo vigente. Posteriormente se realiza un spin para que el líquido que podría estar adherido a las paredes del pocillo, como así también a la parte interna de la septa de goma desciendan.

Finalmente se colocó la placa dentro del analizador genético ABI 3500 de ocho capilares (Applied Biosystems), donde se realiza la electroforesis capilar. Los datos de la corrida se almacenan en el programa de análisis “*data collection*” en forma automatizada de cada una de las muestras.

Tabla 23.

Esquema representativo de la placa de amplificación. (GF- Globalfiler) y (YF-Yfiler)

PLACA DE AMPLIFICACIÓN				
	1	2	4	5
A	LLAVE I - GF	LLAVE IV- GF	LLAVE I -YF	LLAVE IV -YF
B	TELA II - GF	CERAMICA IV – GF	TELA II --YF	CERAMICA IV -YF
C	CERAMICA I - GF	TELA IV – GF	CERAMICA I -YF	TELA IV -YF
D	CARAMICA III - GF	CN-AMP – GF	CARAMICA III -YF	CN-AMP -YF
E	MADERA I - GF	CP-AMP- GF	MADERA I-YF	CP-AMP -YF
F	MADERA III - GF		MADERA III -YF	
G	TELA I - GF		TELA I -YF	
H	TELA III- GF	LADDER – GF	TELA III -YF	LADDER -YF

Procesamiento y análisis de datos.

En esta última etapa se representan los resultados de todas las muestras analizadas en el Analizador Genético. Luego, las mismas fueron procesados en el software de análisis de datos GeneMapper que permite detectar los picos (alelos) presentes en cada una de las muestras, asignándole un tamaño estimado de pb (pares de bases) a cada pico y realizando la asignación alélica de estos picos, de acuerdo a la escalera alélica utilizada, obteniéndose así el correspondiente electroferograma con la información de información genética amplificada de la muestra.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

En el Electroferograma quedan simbolizados todos los fragmentos, que previamente fueron separados por el analizador Genético en forma de pico donde la altura representa el número de veces que se encuentra repetido un STR (*Short Tandem Repeat*- repetición corta en tándem).

En efecto se adjuntan dos electroferogramas de las corridas STRs autosómico y STRs de Cromosoma Y, a modo ilustrativo.

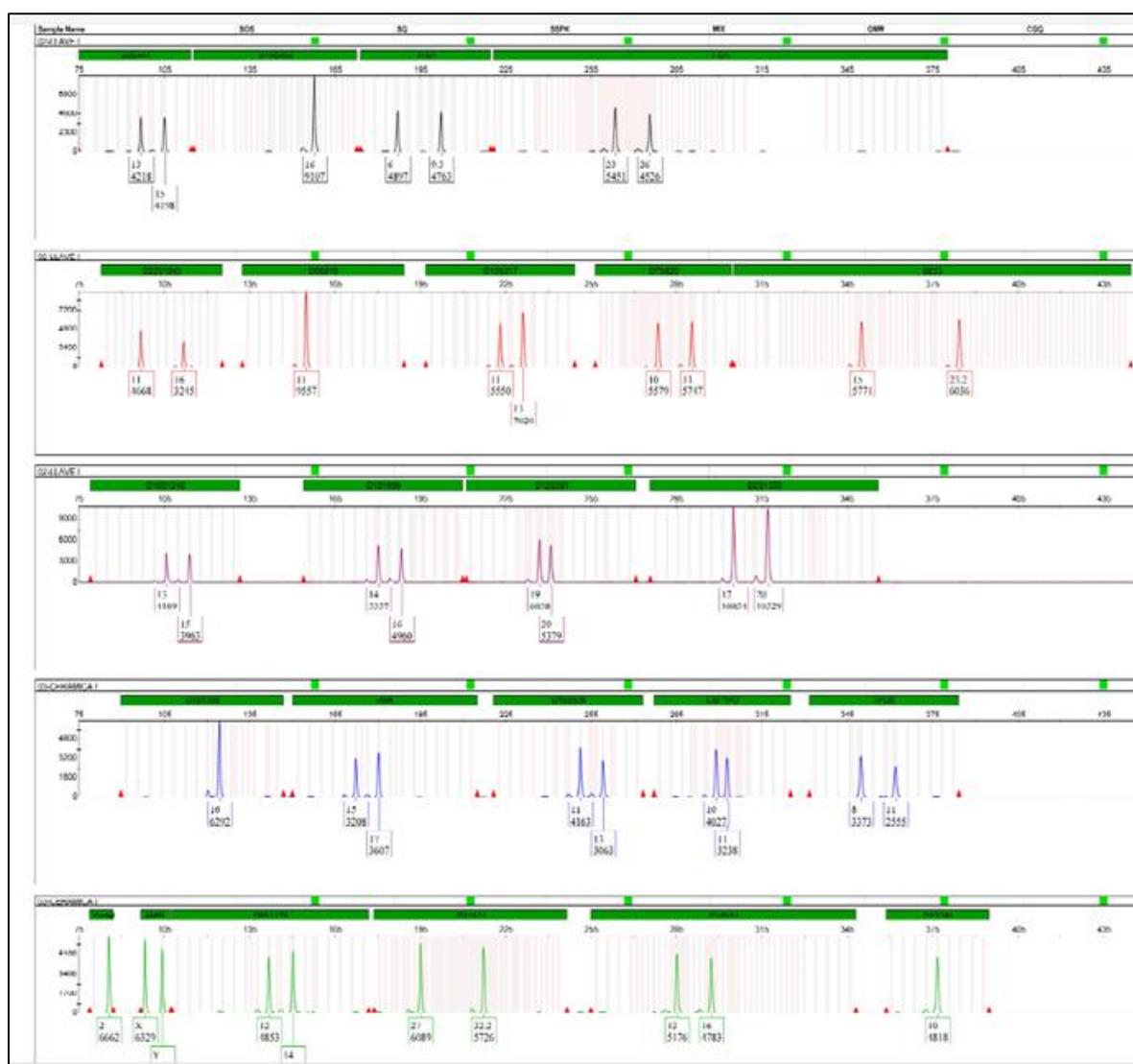


Figura 15. Electroferograma de una corrida STRs autosómica

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

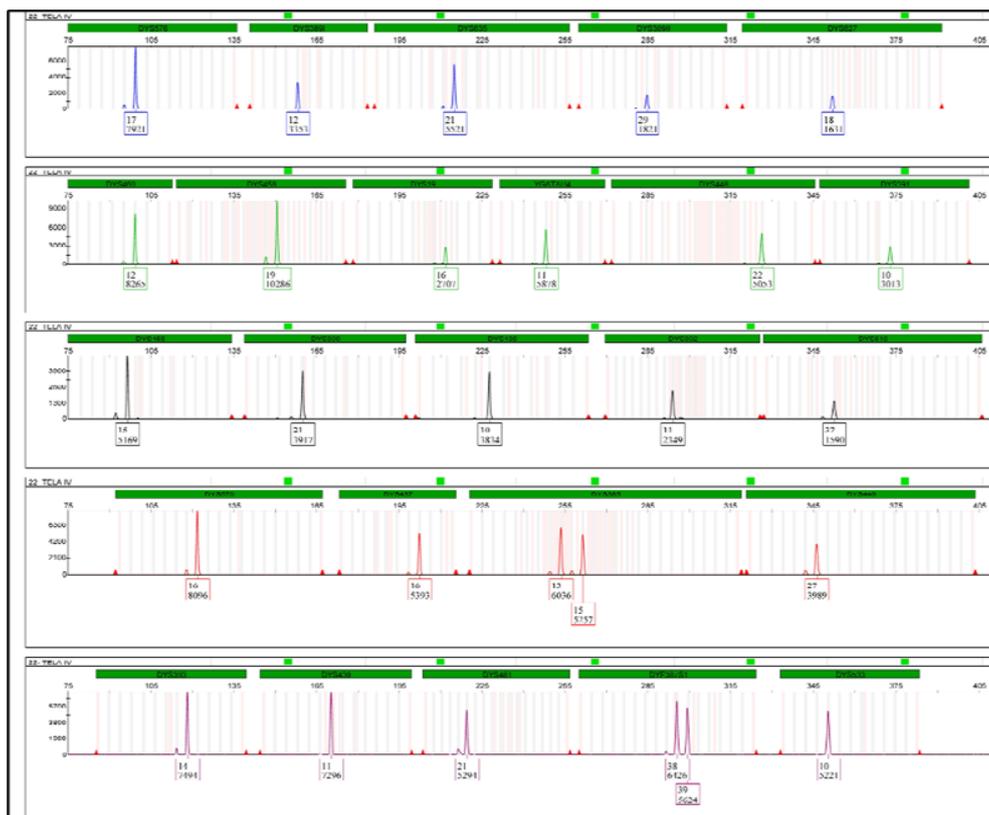


Figura 16. Electroferograma de una corrida STRs de cromosoma Y.

Presentación de resultados y discusión.

Para los licenciados en criminalística, la aplicación del reactivo de luminol ha generado grandes inquietudes, en cuanto a su utilidad en el lugar del hecho y el efecto que puede causar el mismo sobre las muestras, ya que como en el apartado de introducción es un reactivo de orientación y no de certeza (Cuello Videla OA. et. al. 2015) y (Kdenyss k. et al. 2014).

El objetivo general de este trabajo fue la recuperación de perfiles genéticos de muestras que hayan estado en contacto con el reactivo luminol.

Es importante mencionar que el reactivo luminol es una herramienta útil para el investigador para la búsqueda de indicios hemáticos latentes en el lugar del hecho. Sin embargo, existe controversia en cuanto a si el mismo causa degradación del ADN. Asimismo, no se han encontrado hasta la fecha estudios realizados que respondan dicho interrogante en nuestro país, por lo que el presente estudio es de relevancia local.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

A continuación, se exponen las tablas con los resultados obtenidos de las muestras de las que se pudo obtener un perfil genético analizable. En las tablas a continuación, se observan dichos perfiles genéticos, estos se asociaron en base a los grupos de estudio mencionados en la sección metodología (página 21).

En primer lugar, se expone el resultado del análisis de los marcadores STRs autosómico, como así también de STRs de Cromosoma Y, correspondiente a la muestra de referencia, ya que este resultado será el medio de confronte para todas las muestras analizadas.

Perfil Genético - STRs autosómico y STRs de Cromosoma Y de la muestra de referencia.

Tabla 24.
Perfil Genético de muestras de referencia (M.= MUESTRA)

STRs AUTOSÓMICOS		STRs de CROMOSOMA Y	
MARCADORES	M. REFERENCIA	MARCADORES	M. REFERENCIA
D3S1358	16 -16	DYS576	17
vWA	15-17	DYS389I	12
D16S539	11-13	DYS635	21
CSF1PO	10-11	DYS389II	29
TPOX	8-11	DYS627	18
Yindel	2	DYS460	12
AMEL	X-Y	DYS458	19
D8S1179	12-14	DYS19	16
D21S11	27-32.2	YGATAH4	11
D18S51	13-16	DYS448	22
DYS391	10	DYS391	10
D2S441	13-15	DYS456	15
D19S433	16 - 16	DYS390	21
TH01	6-9.3	DYS438	10
FGA	23-26	DYS392	11
D22S1045	11-16	DYS518	37
D5S818	11- 11	DYS570	16
D13S317	11-13	DYS437	16
D7S820	10-13	DYS385	13-15
SE33	15-23.2	DYS449	27
D10S1248	13-15	DYS393	14
D1S1656	14-16	DYS439	11
D12S391	19-20	DYS481	21
D2S1338	17-20	DYF387S1	39-39
		DYS533	10

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Perfil Genético - SRTs autosómico y STRs de Cromosoma Y de las muestras pertenecientes al GRUPO I.

Se recuerda que las muestras de este grupo en primer lugar fueron sometidas a el lavado "1" (agua + detergente) y luego se les aplico el reactivo "1" (Bluestar® Forensic).

Tabla 25.
Perfil Genético STRs autosómico de las muestras correspondientes al grupo I

STRs AUTOSÓMICO DEL GRUPO I				
MARCADORES	LLAVE I	MADERA I	CERAMICA I	TELA I
D3S1358	16	16	16	16
vWA	15-17	15-17	15-17	15-17
D16S539	11-13	11-13	11-13	11-13
CSF1PO	10-11	10-11	10-11	10-11
TPOX	8-11	8-11	8-11	8-11
Yindel	2	2	2	2
AMEL	X-Y	X-Y	X-Y	X-Y
D8S1179	12-14	12-14	12-14	12-14
D21S11	27-32.2	27-32.2	27-32.2	27-32.2
D18S51	13-16	13-16	13-16	13-16
DYS391	10	10	10	10
D2S441	13-15	13-15	13-15	13-15
D19S433	16	16	16	16
TH01	6-9.3	6-9.3	6-9.3	6-9.3
FGA	23-26	23-26	23-26	23-26
D22S1045	11-16	11-16	11-16	11-16
D5S818	11	11	11	11
D13S317	11-13	11-13	11-13	11-13
D7S820	10-13	10-13	10-13	10-13
SE33	15-23.2	15-23.2	15-23.2	15-23.2
D10S1248	13-15	13-15	13-15	13-15
D1S1656	14-16	14-16	14-16	14-16
D12S391	19-20	19-20	19-20	19-20
D2S1338	17-20	17-20	17-20	17-20

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 26.

Perfil Genético STRs de Cromosoma Y de las muestras correspondientes al grupo I

STRs de CROMOSOMA Y - GRUPO I				
MARCADORES	LLAVE I	MADERA I	CERAMICA I	TELA I
DYS576	17	17	17	17
DYS389I	12	12	12	12
DYS635	21	21	21	21
DYS389II	29	29	29	29
DYS627	18	18	18	18
DYS460	12	12	12	12
DYS458	19	19	19	19
DYS19	16	16	16	16
YGATAH4	11	11	11	11
DYS448	22	22	22	22
DYS391	10	10	10	10
DYS456	15	15	15	15
DYS390	21	21	21	21
DYS438	10	10	10	10
DYS392	11	11	11	11
DYS518	37	37	37	37
DYS570	16	16	16	16
DYS437	16	16	16	16
DYS385	13-15	13-15	13-15	13-15
DYS449	27	27	27	27
DYS393	14	14	14	14
DYS439	11	11	11	11
DYS481	21	21	21	21
DYF387S1	39-39	39-39	39-39	39-39
DYS533	10	10	10	10

Perfil Genético - STRs autosómico de las muestras pertenecientes al GRUPO II.

Se recuerda que las muestras de este grupo en primer lugar fueron sometidas a el lavado "2" (agua + lavandina) y luego se les aplico el reactivo "1" (Bluestar® Forensic).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 27.

Perfil Genético STRs autosómico de las muestras correspondientes al grupo II

GRUPO II	
MARCADORES	TELA II
D3S1358	16
vWA	15-17
D16S539	11-13
CSF1PO	10-11
TPOX	8-11
Yindel	2
AMEL	X-Y
D8S1179	12-14
D21S11	27-32.2
D18S51	13-16
DYS391	10
D2S441	11-12-13-15
D19S433	16
TH01	6-9.3
FGA	23-26
D22S1045	11-15-16
D5S818	10-11-12
D13S317	9-11-12-13
D7S820	10-11-13
SE33	15-23.2-26.2
D10S1248	13-15-17
D1S1656	14-15-16-18.3
D12S391	19-20
D2S1338	17-19-20

Perfil Genético - STRs autosómico de las muestras pertenecientes al GRUPO III.

Por su parte a estas muestras se lavaron con agua y detergentes (“Lavado 1”) y posteriormente se le aplicó el “reactivo 2” (Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 28.
Perfil Genético STRs autosómico de las muestras correspondientes al grupo III

GRUPO III			
MARCADORES	MADERA III	CERAMICA III	TELA III
D3S1358	16	16	16
vWA	15-17	15-17	15-17
D16S539	11-13	11-13	11-13
CSF1PO	10-11	10-11	10-11
TPOX	8-11	8-11	8-11
Yindel	2	2	2
AMEL	X-Y	X-Y	X-Y
D8S1179	12-14	12-14	12-14
D21S11	27-32.2	27-32.2	27-32.2
D18S51	13-16	13-16	13-16
DYS391	10	10	10
D2S441	13-15	13-15	13-15
D19S433	16	16	16
TH01	6-9.3	6-9.3	6-9.3
FGA	23-26	23-26	23-26
D22S1045	11-16	11-16	11-16
D5S818	11	11	11
D13S317	11-13	11-13	11-13
D7S820	10-13	10-13	10-13
SE33	15-23.2	15-23.2	15-23.2
D10S1248	13-15	13-15	13-15
D1S1656	14-16	14-16	14-16
D12S391	19-20	19-20	19-20
D2S1338	17-20	17-20	17-20

Perfil Genético - STRs autosómico y STRs de Cromosoma Y de las muestras pertenecientes al GRUPO IV.

Por otra parte, a estas muestras se lavaron con agua y lavandina “Lavado 2”, y posteriormente se les aplico el reactivo “2” (Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky).

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 29.

Perfil Genético STRs autosómico de las muestras correspondientes al grupo IV

MARCADORES	LLAVE IV	CERAMICA IV	TELA IV
D3S1358	16	16	16
vWA	15-17	15-17	15-17
D16S539	11-13	11-13	11-13
CSF1PO	10-11	10-11	10-11
TPOX	8-11	8-11	8 *
Yindel	2	2	2
AMEL	X-Y	X-Y	X-Y
D8S1179	12-14	12-14	12-14
D21S11	27-32.2	27-32.2	27-32.2
D18S51	13-16	13-16	13-16
DYS391	10	10	10
D2S441	13-15	13-15	13-15
D19S433	16	16	16
TH01	6-9.3	6-9.3	6-9.3
FGA	23-26	23-26	23-26
D22S1045	11-16	11-16	11-16
D5S818	11	11	11
D13S317	11-13	11-13	11-13
D7S820	10-13	10-13	10-13
SE33	15-23.2	15-23.2	15-23.2
D10S1248	13-15	13-15	13-15
D1S1656	14-16	14-16	14-16
D12S391	19-20	19-20	19-20
D2S1338	17-20	17-20	17-20

*DO: Drop out

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 30.
Perfil Genético STRs de Cromosoma Y de las muestras correspondientes al grupo IV.

STRs DE CROMOSOMA Y - GRUPO IV			
MARCADORES	LLAVE IV	CERAMICA IV	TELA IV
DYS576	17	17	17
DYS389I	12	12	12
DYS635	21	21	21
DYS389II	29	29	29
DYS627	18	18	18
DYS460	12	12	12
DYS458	19	19	19
DYS19	16	16	16
YGATAH4	11	11	11
DYS448	22	22	22
DYS391	10	10	10
DYS456	15	15	15
DYS390	21	21	21
DYS438	10	10	10
DYS392	11	11	11
DYS518	37	37	37
DYS570	16	16	16
DYS437	16	16	16
DYS385	13-15	13-15	13-15
DYS449	27	27	27
DYS393	14	14	14
DYS439	11	11	11
DYS481	21	21	21
DYF387S1	39-39	39-39	39-39
DYS533	10	10	10

Por último, se expone el resultado del perfil genético del operador técnico que llevó a cabo el presente trabajo, siendo esta otra forma de demostrar que no hubo contaminación a lo largo del proceso.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Perfil Genético - STRs autosómico del personal técnico.

Tabla 31.
Perfil Genético STRs autosómico del personal técnico (M.=muestra)

STRs AUTOSÓMICOS	
MARCADORES	M. REFERENCIA
D3S1358	17-17
vWA	16-17
D16S539	9-14
CSF1PO	12-dic
TPOX	8-11
Yindel	
AMEL	X-X
D8S1179	13-15
D21S11	31-32.2
D18S51	16-18
DYS391	
D2S441	11-14
D19S433	14-16.2
TH01	6-9.3
FGA	20-23
D22S1045	15-16
D5S818	10-12
D13S317	9-10
D7S820	8-8
SE33	22.2-27.2
D10S1248	13-15
D1S1656	16-16.3
D12S391	19-20
D2S1338	19-19

Síntesis de resultados.

Finalmente, los resultados plasmados anteriormente fueron expresados en porcentajes para mayor entendimiento ver tabla adjunta.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Tabla 32.
Resumen de todos los resultados expuestos, expresado en porcentaje.

Perfil Genético	"REACTIVO 1" Luminol de marca BLUESTAR® FORENSIC		"REACTIVO 2" Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky		Total
	LAVADO 1 (agua + detergente)	LAVADO 2 (agua + lavandina)	LAVADO 1 (agua + detergente)	LAVADO 2 (agua + lavandina)	
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	
STRs Autosómicos	100% (4/4)	25% (1/4)	75% (3/4)	75% (3/4)	68,75% (11/16)
Y-STRs	100% (4/4)	0	0	75% (3/4)	43,75% (7/16)
Drop out	0	0	0	25% (1/4)	25% (1/16)
Mezcla	0	25% (1/4)	0	0	25% (1/16)

Discusión de resultados presentados.

Sobre Luminol.

En base a lo expuesto, sin distinción del reactivo luminol utilizado en el trabajo, y al igual que las investigaciones realizadas por Tomas W. Adair y Rebecca L. Shaw (2005) y Castelló, M, *et. al.* 2002, se coincide efectivamente que el reactivo luminol es muy práctico en cuanto a su aplicación y revelado manchas de sangre latentes, que se encuentre en textiles. Sin embargo, en el presente trabajo se pone en evidencia que el reactivo luminol no solo es útil para revelar manchas de textiles, sino también manchas latentes que se encuentren en superficies absorbentes, porosas, lisas y metálicas.

Una limitación en cuanto al entorno de la aplicación del reactivo luminol, es que el mismo debe aplicarse en oscuridad plena para que pueda captarse la reacción lumínica que hace posible evidenciar la mancha hallada. Si comparamos lo expuesto con el lugar del hecho sabemos que no siempre se cuenta con tales características. Es por ello que sin duda alguna se concuerda con lo expuesto por Shanan, S, *et. al.* (2007) en base a la necesidad de una oscuridad total.

Sobre los lavados y soportes.

Con el objeto de simular diversos escenarios delictivos, es que se utilizaron dos tipos diferentes de lavados caseros, uno con agua con detergente y el otro agua y

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

lavandina. Existen trabajos previos en los que se estudia el uso y/o efecto de estos agentes blanqueadores de manera independiente (Adair, T., *et.al* (2005); Castelló, M, *et. al.* (2002) y Edler, C *et. al.* 2019). Sin embargo, no se ha encontrado bibliografía en la que se evalúe el efecto conjunto de estos agentes como en el presente trabajo.

De igual modo a lo concluido por parte en la investigación de Edler, C., *et.al.* (2017), en el presente trabajo se evidencia que las manchas de sangre son difíciles de eliminar por medio de lavados con el uso de agentes químicos, tal como detergente y lavandina de uso cotidiano, indistintamente del tipo de soporte a lavar.

Otro punto por destacar entre a las investigaciones expuestas en el estado de arte, y el presente trabajo es que en este se utilizaron diversos soportes, los cuales no evidenciaron diferenciación alguna frente a la obtención de perfil genético analizado. Es importante mencionar que esta combinación de soportes y de lavados aplicados sobre las muestras no han sido evaluados anteriormente.

Sobre el perfil genético de STRs Autosómicos.

Este punto es el más importante a desarrollar, ya que en base a los resultados expuestos es que se responde el interrogante principal del trabajo en cuestión.

En primer lugar, se confirma que sin distinción del reactivo de luminol aplicado en las muestras analizadas, estos no destruyen completamente al ADN (Edler, C., *et.al.* (2017); Jakovich, C. (2006); Shanan, S, *et. al.* (2007) y Edler, C *et. al.* (2019)). Sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con gran parte de las investigaciones mencionadas en las que recuperan un perfil genético de la totalidad de las muestras analizadas.

Inicialmente, en este proyecto, se analizaron dieciséis muestras, obteniéndose solo el perfil genético analizable del 68,75% (11/16) de ellas, siendo esta otra discrepancia de la información recolectada (Edler, C *et. al.* 2019), ya que algunos de los perfiles obtenidos en el trabajo consultado se hallaban incompletos, quedando imposibilitada la identificación humana.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

En virtud de los resultados obtenidos, se forjaron inquietudes con respecto a la causa de la baja concentración de ADN, por lo que se procedió a estudiar las variantes en común de las muestras no amplificadas. De las cinco muestras excluidas, tres de ellas corresponden al **grupo II** (llave II, cerámica II y madera II), estas fueron sometidas al lavado "2" (agua con lavandina) y luego se les aplicó el reactivo de luminol de la marca Bluestar® Forensic. Otra de las muestras excluidas corresponde al **grupo III** (llave III), la cual fue sometida al lavado "1" (agua con detergente) y luego se expuso al reactivo de luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky. La muestra faltante corresponde al **grupo IV** (madera IV) muestra que se le aplicó el lavado "2" (agua con lavandina) y comparte el reactivo de luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky.

Estos resultados indican que el bajo rendimiento de ADN podría deberse a los reactivos de luminol. No obstante, si esto fuera así todos los resultados informados deberían verse afectados. De hecho, expresado el resultado en porcentaje se pudo recuperar el perfil genético completo del aproximadamente 70% de las muestras que fueron sometidas a los distintos reactivos de luminol.

Por consiguiente, se puede estimar que la baja concentración de ADN aproximadamente del 30 % de las muestras que fueron excluidas del análisis comparten la variante del lavado "1", agua con lavandina. Por lo tanto, dicha condición puede ser atribuida al agente blanqueador utilizado, concordando así con la teoría de investigador Edler, C *et. al.* 2019. quien concluyó que el uso de agentes blanqueadores basado en compuestos de cloro causa una reducción en las concentraciones de ADN.

En otro orden de ideas, sobre el 68,75% de las muestras estudiadas se recuperó un perfil genético analizable. Por un lado, el 31,25 % de las mismas fue sometida al reactivo luminol de marca Bluestar® Forensic; haciendo la distinción de que al 31,25 % se le aplicó el lavado "1" (agua con detergente); mientras que al 6,25% restante fue sometido al lavado "2" (agua y lavandina). Por otra parte, se destaca que el 37,5% de las demás muestras se trataron con el luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky, donde el 18,75% de las muestras corresponde al grupo III, las cuales se las enjugaron con del lavado "1" (agua y detergente) y el 18,75% de las muestras

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

sobrantes corresponden al grupo IV, las que fueron sometidas al lavado "2" (agua con lavandina).

Como resultado de lo plasmado en el párrafo anterior se comprueba que para las muestras obtenidas en este trabajo que a diferencia de lo investigado por Jakovich, C. (2006), si hubo una pequeña diferencia entre los reactivos de luminol, siendo el mayor porcentaje de perfil genético recuperado el que fue tratado con el reactivo de luminol preparado según Grodsky.

Esto no quiere decir que el reactivo de la marca Bluestar® Forensic sea destructivo o degrade el ADN, tal como lo afirma Piva de Almeida, J et al. (2011) en su investigación, ya que en el presente trabajo no se contempló como variable el tiempo transcurrido desde la exposición al reactivo luminol, como plantea el trabajo de Piva de Almeida. No obstante, esto genera una nueva inquietud al presente trabajo, ya que en un escenario donde se presume que ha ocurrido un hecho delictivo el lapso de tiempo transcurrido desde el momento del acto hasta la investigación puede variar entre días, meses o incluso años, debido a que esto se encuentra sujeto a las acciones procesales. De aquí que surge una nueva hipótesis a verificar.

Es importante remarcar que el análisis procedente de la muestra identificada como TELA IV, presentó en su perfil un *drop-out* alélico, (pérdida de un alelo), este artefacto ocurre frecuentemente en muestras con bajas concentración de ADN. Sin embargo, no fue lo suficientemente baja, ya que se logró recuperar un perfil genético analizable de la misma.

También se observó que el resultado de la muestra identificada como TELA II, presentó un perfil mezcla, por lo que fue comparado con los perfiles de las muestras de referencia y del personal técnico, llegando a la conclusión que el perfil genético se compone por al menos dos individuos, donde uno corresponde al individuo que aportó la muestra de referencia y el otro podría corresponder al individuo que proporcionó el soporte al principio del trabajo.

Sobre perfil genético STRs Cromosoma Y.

Como aporte científico a todo lo expuesto también se realizó la recuperación del perfil genético STRs de cromosoma Y, ya que la muestra de referencia utilizada fue

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

aportada por un individuo de sexo masculino. Es importante recordar que el proceso se inició con dieciséis (16) muestras, y fueron excluidas del análisis las muestras que presentaron baja concentración de ADN (5), las cuales se detallaron en el texto referente a la recuperación de perfil STRs autosómico. En relación al análisis de los resultados se expone que de las once (11) muestras amplificadas solo se recuperó el perfil genético analizable de siete (7) muestras. Estos resultados, dan lugar al análisis de las variantes de las nueve muestras que no se logró obtener un perfil genético STRs de Cromosoma Y.

De las nueve muestras, cinco de ellas presentaron baja concentración de ADN STRs de Cromosoma Y; tres de ellas corresponden al **grupo II** (llave II, cerámica II y madera II), estas fueron sometidas al lavado "2" (agua con lavandina) y luego se les aplicó el reactivo de luminol de la marca Bluestar® Forensic. Otra de las muestras excluidas corresponde al **grupo III** (llave III), la cual fue sometida al lavado "1" (agua con detergente) y luego se expuso al reactivo de luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky. La muestra faltante corresponde al **grupo IV** (madera IV) muestra que se le aplicó el lavado "2" (agua con lavandina) y comparte el reactivo de luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky.

De igual modo, se estima que la baja concentración de ADN de las muestras que fueron excluidas del análisis comparte la variante del lavado "1", agua con lavandina. Por lo tanto, dicha condición puede ser atribuida al agente blanqueador utilizado, concordando así con la teoría de investigador Edler, C *et. al.* 2019. Quien concluyó que el uso de agentes blanqueadores basado en compuestos de cloro causa una reducción en las concentraciones de ADN.

Con respecto a las cuatro muestras sobrantes que no se vieron afectadas por la cantidad de ADN, sabemos que una de ellas corresponde **grupo II**, que fue tratada con el lavado "2" (agua con lavandina) y al reactivo de marca Bluestar® Forensic; mientras que las tres muestras restantes corresponden **grupo III**, que fueron expuestas al lavado "1" (agua con detergente) y al reactivo luminol preparado mediante Grodsky.

A raíz de todo lo expuesto podemos concluir al igual que en el apartado anterior de amplificación de STRs autosómicos se descarta la interferencia o degradación de

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

ADN por causa de los reactivos de luminol utilizados. Pero de aquí que surge otro interrogante referente a lo sucedido, que puede o no estar asociado a los lavados y/o la combinación de éstos con los reactivos luminol, siendo este último una variante vinculante entre las muestras.

Finalmente, el análisis precedente deja abierta la posibilidad de llevar a cabo otra investigación complementaria referente a las inquietudes que se fueron presentando a lo largo del trabajo, los cuales excedieron el enfoque principal del mismo y por lo tanto son temas que deben ser estudiados en profundidad con el objeto de generar nuevos conocimientos.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

III. CONCLUSIONES.

- Los soportes utilizados en el presente trabajo no mostraron influencia en la recuperación de perfiles genéticos analizables luego del tratamiento de lavado aplicado, lo que tiene concordancia con los trabajos previos detallados en el apartado de discusión.
- En base a lo expuesto en la discusión respecto a la falta de bibliografía en la que se evalúe el efecto conjunto de agentes blanqueadores y reactivo luminol como en el presente trabajo, se concluye que la combinación de estos, sin distinción del reactivo luminol utilizados, produjo una desnaturalización y/o destrucción de muestra; ya que solo se pudo obtener un perfil genético analizable de STRs autosómico del 68,75% y 43,75% de STRs de Cromosoma Y, de las muestras analizadas.
- A la hora de evaluar la aplicación más conveniente del reactivo luminol, se considera que la combinación menos lesiva fue la del reactivo luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky; ya que con ambos agentes químicos (detergente y lavandina), fue posible recuperar un perfil genético analizable del 37.5 % de las muestras.
- En cuanto a la cantidad de ADN extraído del 100% de las muestras estudiadas, solo el 68,75% de las mismas presentaron suficiente cantidad de ADN tanto para STRs autosómico, como así también STRs de Cromosoma Y.
- Respecto a lo discutido anteriormente, la calidad del perfil genético obtenido en cuanto a la cantidad de alelos detectado se arribó a que la misma fue del 100%, ya que para 68.75% de las muestras analizadas, permitió la correspondiente identificación humana.

En síntesis, este trabajo reveló que los reactivos de Luminol ensayados bajo las condiciones evaluadas no destruyen al ADN, ya que fue posible recuperar un perfil genético analizable en el 68,75% de las muestras ensayadas, haciendo posible la

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

correcta identificación humana. Sin embargo, en el 31,25 % las muestras analizadas, no se logró la recuperación de un perfil genético debido a que presentaron bajas concentraciones de ADN, por lo tanto, fueron excluidas del trabajo. Concluyendo a que el bajo rendimiento referente a la concentración de ADN puede o no ser atribuido a los lavados y/o la combinación de éstos con los reactivos luminol.

Finalmente, tal como se mencionó anteriormente en el apartado de la discusión de resultados, se propone que a futuro se realicen otras investigaciones de carácter complementario referentes a los interrogantes que se fueron presentando, los cuales excedieron el enfoque principal de este trabajo y por lo tanto deben ser estudiados en profundidad con el objeto de generar nuevos aportes científicos.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

IV. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

1-Tomas W. Adair y Rebecca L. Shaw (2005). Enhancement of bloodstains on washed Clothing using lumunol and LCV reagents. *IABPA News*, 21(4), 4-10.

2- Edler, C., Gehl A., Kohwagner J., Walther M., Krebs O y Agustin C. (2017). Blood Trace Evidence on Washed Textile-a systematic approach. *Int J Legal Med*. 131(4),1179-1189. DOI:10.1007/s00414-017-1549-y.

3- Catillo Ponce A., Álvarez Seguí M., Miquel Feucht M. y Verdú Pascual F.A. (2002). Revelado de manchas latentes: Efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio de DNA. *Cuaderno de Medicina Forense N°28*, 33-36.

4- JAKOVICH C.J. (2007). STR Analysis Following Latent Blood Detection by Luminol, Fluorescein, and BlueStar. *Journal of Forensic Identification*. 57(2), 193-198.

5- Piva de Almeida J., Glesse N., y Bonorino C. (2011). Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction. *Forensic Science International*, 206, 58-61.

6-Edler C., krebs O., Gehl A., Palatzke K., Tiedemann N., Schröder A.S. y Klein A. (2020). The effect of bleaching agents on the DNA analysis of bloodstains on different floor coverings. *Int J Legal Med*, 134(3),921-927. DOI: 10.1007/s00414-020-02250-y.

7- Gross A.M., Harris K.A. y Kaldun G.L. (1999) The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci*, 44(4),837–840.

8 -Brûel A., Christensen I.E., Trantum-Jensen J., Qvortrup K. y Geneser F. (2014). *Geneser Histología*. México D.F: Editorial Medica Panamericana.

9- Palacios J.R. (2009). *Sistema Inmune y Sangre*. Barcelona: Col·legi Oficial d'Infermeres i Infermers de Barcelona. Recuperado de www.infermeravirtual.com

10-Keily Sáez (2017). *Sangre y Tejido hematopoyético*. Editorial Cybercell. Recuperado de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/sangre_y_tejido_hematopo-yetico.pdf.

11- Marcella M. Sniegovski., Jewers M. Bortolatto. y Fernanda Formolo (febrero del 2017). Manchas de Sangre: El Análisis de su Patrón en la Escena del Crimen. *Revista Skopein. Publicación Trimestral Año IV · N°14*, 6-17.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

12- Blanco A., y Blanco G. (2016). *Química biológica*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: El Ateneo 10^a Edición.

13- Curtis H., Barnes S., y Schnek A. (2008). *Biología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana 7^{ma} Edición.

14- Rodríguez C., Murguía B., Rosales M., Rojas A. C., Sortibrán A. y Arnaiz R. (2010). *GENETICA FORENSE*. Revista Fuente Año 2, No. 4. *Recuperado de: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/01-04/4.pdf//>*

15- Nussbaum R., McInnes R., y Willard (2008). *Genética en Medicina Thompson & Thompson*. España: Elsevier Masson.

16- Caro P., (2004). *Manual de Química Forense*. Buenos Aires, Argentina: La Rocca.

17- Prieto Solla L. et. al, (2019). Interpretando la Genética Forense.

18- Villalobos R.H., (2017). Lo que se debe saber acerca de Las pruebas de ADN en el contexto forense. *Revista Científica Forense*, 3(2).1-11.

19- James SH., Kish PE y Sutton PT. (2005). *Principles of bloodstain pattern analysis*. Editorial Taylor & Francis group. 369 -389.

20- Cuello Videla OA. (2015). Luminol tras las huellas del crimen. *Revista digital de criminología y seguridad*. 30-40.

21- Kdenyss K. (2014). BLUESTAR® Reactivo Revelador para Manchas de Sangre oculta. *Revista On-Line de Criminalística*. 1-4.

22- Maldonado D.I. y González Flores K. (2006), División De Ciencias Naturales Y Exactas/Universidad De Guanajuato, Guanajuato, México.

23- Zenteno G.V., y Báez Contreras M. E. (2017). *Historia y Utilización del Luminol en el Escenario del Crimen, Estudio criminal*. *Recuperado de: <https://www.estudiocriminal.eu/blog/historia-y-utilizacion-del-luminol-en-el-escenario-del-crimen>*

24- Revista de Criminalística. Publicación Trimestral Año IV · N°14 · diciembre 2016 - febrero 2017 - Revista Skopein - Criminalística y Ciencias Forenses

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

V. ANEXOS.

Anexo I – materiales y métodos.

Soportes:

- Cuatro fragmentos rectangulares de tela de toalla de color claro.
- Fragmento de madera de color oscuro subdividido en cuatro partes.
- Cuatro llaves de color plateado.
- Cuatro cerámicas de morfología circular y con detalles en bajo relieve.

Reactivos:

- Luminol mediante la fórmula casera de Grodsky.
- Luminol de la marca registrada BLUESTAR® FORENSIC.

Lavados:

- Lavado I: agua corriente con lavandina de la marca comercial “DISLIMP”.
- Lavado II: agua corriente con detergente de la marca comercial “MAGISTRAL”.

Cabe destacar que los lavados serán llevados a cabo de manera manual y con la utilización de una esponja.

Materiales:

- Vaso de precipitado de 100, 250 y 500 ml.
- Varilla de vidrio.
- Pipetas de vidrio de 10, 25 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Probetas de 250 ml y 500 ml.
- Pulverizador de plástico con capacidad de 125 ml.
- Pinzas quirúrgicas.
- Tijeras quirúrgicas.
- Agua destilada.
- Guantes de nitrilo talle “S”.
- Hisopos estériles
- Balanza analítica de marca “”, modelo con resolución
- Esponja símil goma espuma.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

- Cámara fotográfica, marca NYKON, modelo D3100.

Material y reactivos para extracción de ADN.

- kit PrepFiler express™ (Thermo Fisher Scientific).
- AutoMate Express™ (Thermo Fisher Scientific).
- columna de extracción (*LySep*) acoplada a un tubo de lisis.
- Reactivo DTT.
- Thermoshaker
- Centrifuga.
- Tips holders
- Tubos de elusión
- Freezer a -20°C

Material y reactivos para cuantificación de ADN.

- Equipo: Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Instrument con el Software HID Real-Time PCR Analysis v1.2 pre-cargado
- Kit Quantifiler Trio DNA Quantification (P/N 4482910) y /o Kit Quantifiler HP DNA Quantification (P/N 4482911)
- Pipetas varias (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Tips con filtro (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Tubos de 1.5mL
- Microamps Optical 96-Well Reaction Plate (P/N N801-0560)
- Micro Amp™ Optical Adhesive Film (P/N 4360956)
- MicroAmp™ Splash-Free 96-Well Base (P/N 4312063)
- Micro Amp™ Adhesive Film Applicator (P/N 4333183)
- Vortex
- Centrifugas (para tubos y placas)
- Guantes
- Marcador
- Calculadora

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Material y reactivos para amplificación de STRs autosómicos.

- Equipo termociclador marca Veriti
- Kit Globalfiler (P/N 4476135)
- Muestras de DNA purificadas y cuantificadas
- Buffer lowTE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0
- Microcentrífuga
- Pipetas (10ul, 20ul, 200ul, 1000ul)
- Tips con filtro (10ul, 20ul, 200ul, 1000ul)
- Tubos de 0.2ml
- Vortex
- Marcador
- Calculadora
- Guantes
- Tubos de 1.5ml

Material y reactivos para amplificación de STRs cromosomas Y.

- Equipo termociclador marca Veriti
- Kit Yfiler Plus (P/N 4484678)
- Muestras de DNA purificadas y cuantificadas
- Buffer lowTE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0
- Microcentrífuga
- Pipetas (10ul, 20ul, 200ul, 1000ul)
- Tips con filtro (10ul, 20ul, 200ul, 1000ul)
- Tubos de 0.2ml
- Vortex
- Marcador
- Calculadora
- Guantes
- Tubos de 1.5ml

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Material y reactivos utilizados en la electroforesis Capilar.

- Agua desionizada tipo -mili-Q o similar
- Contenedor con Buffer de cátodo 1X (CBC) (Applied Biosystem o similar)
- Contenedor con Buffer de ánodo 1X (CBC) (Applied Biosystem o similar)
- DNA Away o similar (Descontaminador)
- Etanol 70%, grado comercial
- Etanol 95%, grado comercial
- Escaleras alélicas para el Kits a utilizar (Applied Biosystem o Promega)
- Formamida desionizada (Applied Biosystem o similar)
- Marcador de peso molecular Liz -600 c
- Polímero POP 4 Applied Biosystem.

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

Anexo II- preparación de reactivos.

Preparación del luminol de marca BLUESTAR® FORENSIC

Iniciando con la preparación del "REACTIVO 1", luminol de la marca registrada BLUESTAR® FORENSIC, esta solución fue elaborada de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para ello se utilizó un KIT BLUESTAR® FORENSIC, compuesto por una botella de spray con 175 ml de agua destilada y un estuche sellado de manera individual y cerrado herméticamente conformado por una tableta de color blanco (catalizador) y otra tableta de color beige (el reactivo). Subsiguientemente se describe el procedimiento realizado.

1. Se realiza la apertura de los estuches contenedores de las tabletas las cuales se colocaron en un ojo de vidrio y con la ayuda del mango de mortero se procedió a pulverización de estas.
2. Ya teniendo pulverizadas las tabletas se vierten en la botella de spray que posee 175 ml de agua destilada.
3. Luego se agita suavemente y con movimientos envolventes durante 1 o 2 minutos para que los sólidos agregados se diluyan, quedando así el reactivo listo para aplicar.

Preparación del luminol casero mediante la fórmula de Grodsky.

A continuación, se lleva a cabo la preparación del "REACTIVO 2", Luminol casero preparado mediante la fórmula de Grodsky, la cual se trata de una solución compuestas por los siguientes solutos: Luminol ($C_8H_7N_3O_2$), Perborato de sodio ($NaBO_3$) y Carbonato sódico (Na_2CO_3), que deberán ser disueltos en agua destilada como solvente.

En primer lugar, a la hora de preparar el luminol mediante esta técnica, se calcularon las proporciones de los reactivos considerables para obtener 125 ml de solución de luminol, como resultado de los cálculos se obtienen los siguientes pesajes

TRABAJO INTEGRADOR FINAL

0,3 gr. de Luminol ($C_8H_7N_3O_2$), 1 gr. de Perborato de sodio ($NaBO_3$); 6 gr. de Carbonato sódico (Na_2CO_3). Seguidamente se describe el procedimiento realizado.

- 1- Se peso 1 gr. de Perborato de sodio $NaBO_3$ en una balanza analítica, el cual se vertió en un vaso de precipitado de 250 ml.
- 2- Se pesaron 6 gr. de carbonato de sodio Na_2CO_3 y 0,3 gr. de luminol $C_8H_7N_3O_2$, ambos se colocaron juntos en un vaso de precipitados de 100 ml.
- 3- Con la ayuda de pipetas de 50 y 25 ml se midieron 125ml de agua desmineralizada.
- 4- Luego se agregaron los 125 ml de agua bidestilada al vaso de precipitados que posee 1gr. de Perborato de sodio $NaBO_3$.
- 5- Luego se utilizó una varilla de vidrio para mezclar bien la solución hasta obtener una disolución completa del soluto.
- 6- Teniendo homogenizada la solución de agua y Perborato de sodio $NaBO_3$, se vierten los 6 gr. de carbonato de sodio Na_2CO_3 y 0,3 gr. de luminol $C_8H_7N_3O_2$.
- 7- Nuevamente con una varilla de vidrio de remueve la solución hasta que ambos solutos se encuentren disueltos.
- 8- Por último, la solución resultante se coloca en un pulverizador de plástico de color blanco de aspecto opaco y se resguarda en un ambiente oscuro hasta ser aplicado.