

Optimización para la recuperación de espermatozoides de las muestras en casos de delito sexual

Dra. Paola Solano Naranjo
Sección de Biología. Departamento de Ciencias Forenses

La búsqueda de semen (tanto fluido seminal por medio de proteínas propias del líquido, así como el conteo de los espermatozoides) ha sido utilizado a nivel mundial como una herramienta auxiliar fundamental de la justicia y es, en nuestros días, uno de los principales fluidos buscados en el campo de las ciencias forenses para identificar a un individuo por medio de su ADN.

Los casos de delito sexual en el país representan el 5,9% de la totalidad de las denuncias interpuestas ante el Ministerio Público según lo publicado por el “*Observatorio de violencia de género contra las mujeres y acceso a la justicia*” dentro del periodo comprendido entre el 2014- 2018.

Para la Sección de Biología Forense, del Departamento de Ciencias forenses, del Organismo de Investigación Judicial (OIJ) esto es una realidad diaria, ya que en 2018, por ejemplo, de la totalidad de casos que ingresaron a la Unidad Centralizada de Inspección de Indicios (UCII), el 38% pertenecen a casos de delito sexual. Siendo un porcentaje tan alto y siendo muchas veces los involucrados, parte de las poblaciones vulnerables, se hace imperativo que se realice el mayor esfuerzo por parte de los expertos en asegurar la presencia, o no, de dicho fluido.

El árbol de navidad: una técnica eficaz para la investigación

La técnica de “*árbol de navidad*” es uno de los métodos utilizados en la Sección de Biología Forense para detectar semen en los indicios recibidos por medio de la observación de la muestra en el microscopio.

Para esto se toma el objeto en cuestión, se hace una extracción del indicio o soporte en un líquido especial (buffer de extracción) para despegar los espermatozoides que puedan estar presentes en un tiempo definido y luego lo extraído se coloca en una laminilla para observarla al microscopio. Pero antes, se necesita teñirla con unos colorantes especiales que hacen que el espermatozoide se vea rosado y su flagelo (comúnmente llamado “cola”) en verde, de ahí el origen del nombre de la técnica.

En el caso del Departamento de Ciencias Forenses, las muestras que pasan a estos análisis de “*árbol de navidad*”, son las muestras en las que no se ha logrado determinar la presencia de este fluido (semen), por los otros métodos previos para detectar semen, de los cuales se echa mano dentro del flujo del proceso analítico.

El método de búsqueda de espermatozoides a través del microscopio AX10 por medio de la técnica “*árbol de navidad*”, es un método confirmatorio para declarar la presencia de semen en un determinado soporte, se hace una búsqueda directa de los espermatozoides (células reproductoras masculinas con una morfología característica del resto de las células corporales) por lo que al hallar uno, se puede asegurar que hay semen en el indicio, ya que es el único fluido corporal que posee este tipo de células.

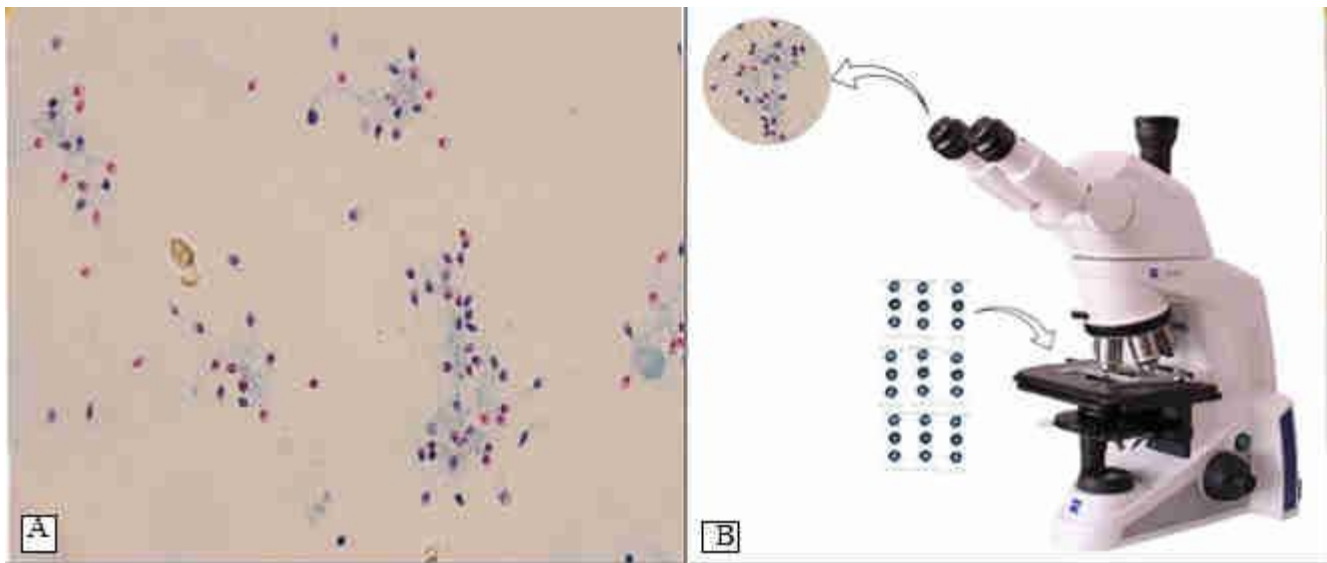


Figura 1. Muestra de espermatozoides con tinción de “*árbol de navidad*”;(B) Microscopio ZEISS modelo AX10

La optimización de este método de análisis es de vital importancia pues existen muchos factores que pueden dificultar la recuperación de los espermatozoides, por ejemplo, características de las prendas y objetos en análisis, el tiempo transcurrido desde que se dieron los hechos investigados e incluso particularidades fisiológicas de los donantes como que genere baja producción de este tipo de células. En el año 2019, se realizó la optimización de este método para determinar si el protocolo de trabajo utilizado era el óptimo o si requería de modificaciones para poder asegurar una mejor y más eficiente recuperación de espermatozoides a partir de los soportes, ya que como se mencionó anteriormente, muchas veces cuando se llega a esta parte del flujo de trabajo es porque no se ha logrado evidenciar semen con las otras técnicas preliminares y son muchas veces las únicas muestras con las que se cuenta para efectivamente ver si este tipo de indicio está presente.

Método de Optimización

La optimización consistió en evaluar dos parámetros de análisis: Uno es el tiempo de extracción y el otro es el volumen de muestra en las laminillas y valorar su impacto positivo en la recuperación de los espermatozoides que se evidencia en un mayor conteo de las células. La selección de los parámetros se sustentó en los siguientes aspectos:

1. Tiempo de extracción: a razón de que es el tiempo que se deja la muestra a analizar en un líquido que facilite “despegar” los espermatozoides del soporte, tomando en cuenta que son indicios secos, a veces con mucho tiempo de bodegaje, este fenómeno de desecación pudo hacer que las células se adhieran con mayor fuerza al soporte y por ende requieran de un mayor tiempo de extracción en este líquido. Por lo tanto, se evaluaron diferentes tiempos (30 minutos, 2 horas y 12 horas) en procura de determinar si el incremento en el tiempo aumentaba la cantidad de espermatozoides recuperados.

2. El segundo parámetro por medir fue el volumen depositado en las laminillas para su observación en el microscopio. Una vez que la muestra es extraída en el líquido, se toma, según el protocolo actual de la Sección, un volumen de 3 microlitros (0,003 ml) para poner en la lámina para observar en el microscopio y contar los espermatozoides, sin embargo, también se probó con otro volumen para observar si aumentando la cantidad de la muestra, había diferencia en la cantidad de los espermatozoides observados.

Para este estudio se tomaron 25 muestras de tela de algodón y se les agregó 100uL de semen (previamente analizado y con un recuento de espermatozoides normal), se dejaron secar y luego de cada una se tomó un recorte para dejar en extracción en tres diferentes periodos de tiempos: 30 minutos, 2 horas y 12 horas.

Luego de cada uno de estos extractos se montó en láminas de microscopio dos volúmenes, uno 3 microlitros (según el procedimiento normado de la Sección) y otro de 10 microlitros (variante de volumen) de cada muestra, posterior a esto se procedió con la tinción de rutina del “árbol de navidad” y luego de teñir las muestras se realizó el recuento de los espermatozoides presentes en cada una de las muestras, como se puede ver en la figura 2.

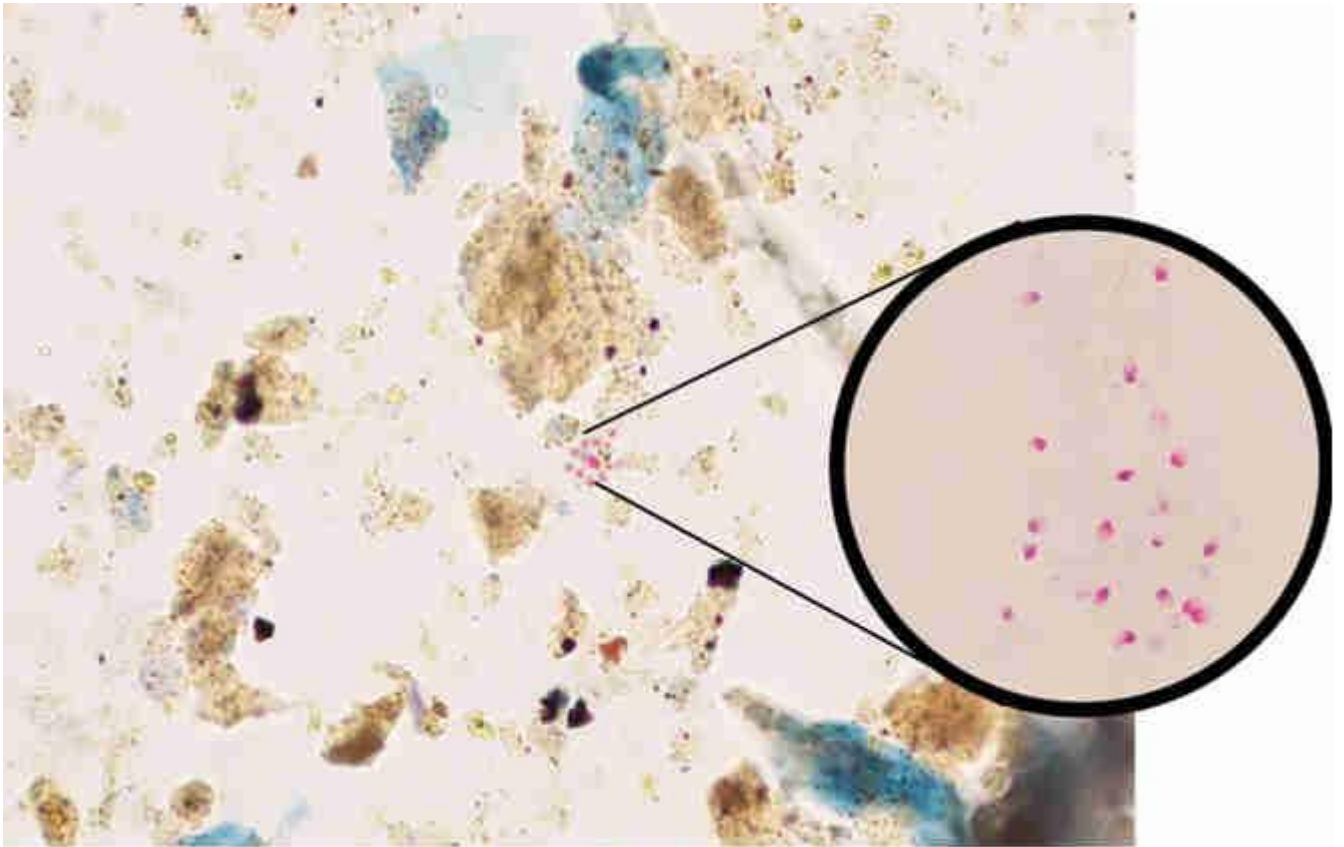


Figura 2. Cabezas de espermatozoides siguiendo la técnica de CT (Christmas Tree/Árbol de Navidad)

Luego de la parte experimental, se realizó el análisis estadístico por medio de gráficas de residuos, que abarcan los ajustes de regresión y ANOVA y con esto poder evaluar si realmente las diferencias que se observan por las variaciones de los parámetros en estudio son estadísticamente importantes o no.

Se realizaron las siguientes pruebas estadísticas:

- **Estudio de Linealidad.**
- **Prueba de Barlett.**
- **Análisis de varianzas.**
- **Análisis de efecto volumen.**
- **Análisis de efecto tiempo.**
- **Prueba Tukey.**

Los resultados que se obtuvieron se evaluaron por medio de las siguientes hipótesis: “hipótesis nula” (H_0) que es la que se quiere probar como verdadera o el

caso contrario, la hipótesis alternativa (H_1) que sería la afirmación contraria o que no lleva un comportamiento estadístico común.

Asimismo, para aprobar o rechazar dichas hipótesis se deben realizar pruebas estadísticas para probar que existe un cambio significativo en el análisis y que es improbable que sea al azar, para esto se debe tomar en cuenta los valor Alpha y el P-valor, para así evidenciar alguna diferencia estadística, en otras palabras, si el P-valor es menor que Alpha se tendrá una diferencia estadística mayor, que puede ser producto de algún factor como el tiempo o la cantidad de volumen agregado a las muestras o de ambos.

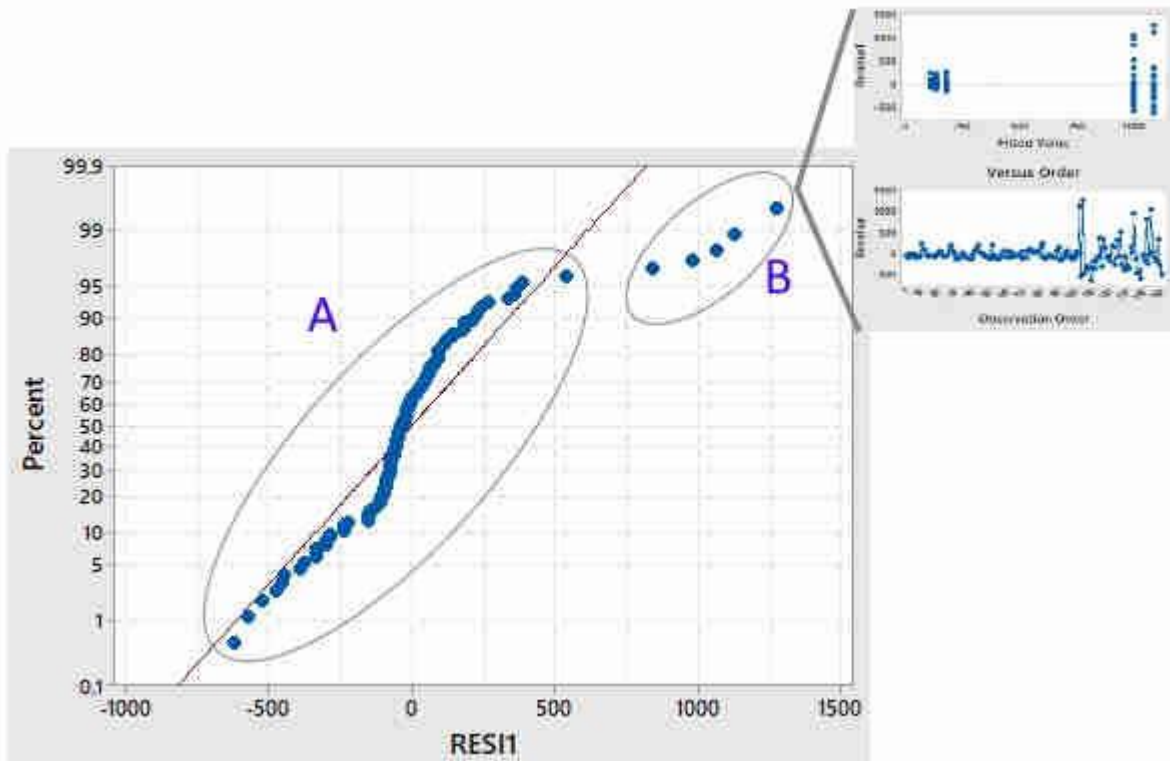


Figura 3. Ajuste de regresión y ANOVA, por medio de la relación porcentaje de muestra vs residuales.

Primeramente, se evalúa la linealidad de los datos (figura 3), el cual muestra dos poblaciones de datos, donde los primeros valores presentan un comportamiento lineal (grupo A), sin embargo, hay otro grupo de datos que no se distribuyen de una manera lineal (grupo B), esto quiere decir que, para efectos del análisis que se realiza en la Sección de Biología, hay un factor, sea volumen o tiempo, que provoca que la linealidad del análisis se pierda.

Estudio de Linealidad

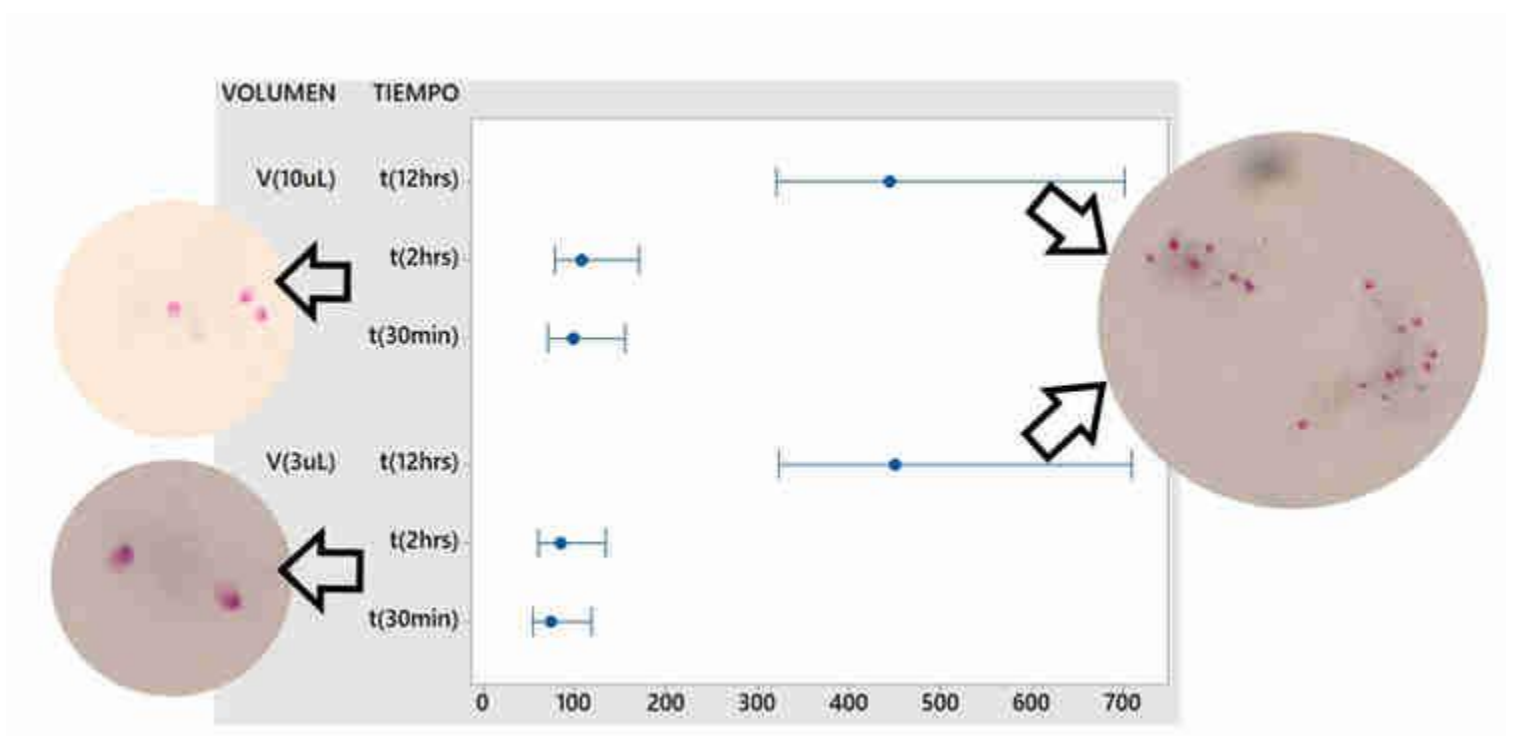
Para esto se deben realizar dos hipótesis y analizar los valores Alpha y P-valor obtenidos en dicho análisis:

H0: Los valores tienen distribución normal.

H1: Los valores no tienen distribución normal.

Con un nivel de confianza del 95% (valor $\alpha = 0,05$) y un P-valor = 0,005, se puede decir que se descarta H0, debido a que el P-valor obtenido es menor al valor α establecido.

De esta forma y gracias al comportamiento característico de los datos, se deben realizar otras pruebas estadísticas que nos permitan determinar cuáles factores favorecen al aumento en el conteo de espermatozoides.



Prueba de Barlett

Figura 4. Prueba de Barlett, se utiliza para probar si las muestras provienen de las poblaciones con diferentes varianzas.

La prueba de Barlett, nos indica la homogeneidad de los datos, es decir, si todas las muestras se comportan iguales o si hay algún conjunto de datos que se salen de lo esperado. En la figura 4, se puede ver de una manera clara que tanto en el volumen 10 μ L como en 3 μ L a las 12 horas presentan un comportamiento especial, sin embargo, no se puede determinar cuál es el factor (volumen o tiempo) que causa esta anomalía.

La prueba de “Barlett” plantea las siguientes hipótesis:

H0: Las varianzas son iguales

H1: Al menos una varianza es diferente, esto es que algún conjunto de datos se dispersa de los valores esperados

El valor “p” obtenido es de 0,000 con un 95% de confianza, por lo que nuevamente se descarta la hipótesis H0 y se acepta la H1 que dice que al menos una varianza es diferente, por lo tanto, alguno de los factores (tiempo o volumen), es el causante de dicho aumento en el conteo de espermatozoides.

¿Cuál factor entre Tiempo y volumen influye positivamente en la cantidad de conteo de cabezas de espermatozoides?

Primeramente, se debe realizar un análisis de varianza para ver si hay interacción entre la variable volumen y la variable tiempo, para esto se plantearon las siguientes hipótesis:

H0: No hay interacción entre los niveles de volumen y los niveles de tiempo que influya en la cantidad de cabezas de espermatozoides contadas.

H1: Existe interacción entre los niveles de volumen y los niveles de tiempo que influya en la cantidad de cabezas de espermatozoides contadas.

Se acepta la H0, al obtener un valor “p” mayor a un valor “alpha”, como se puede observar en la figura 4 (volumen – tiempo) y se concluye que no hay interacción entre los factores (tiempo – volumen) que se utilizaron para la optimización del método, en otras palabras, alguno de los factores afecta por separado el recuento de espermatozoides

¿La cantidad de volumen es la responsable de obtener más recuento de espermatozoides?

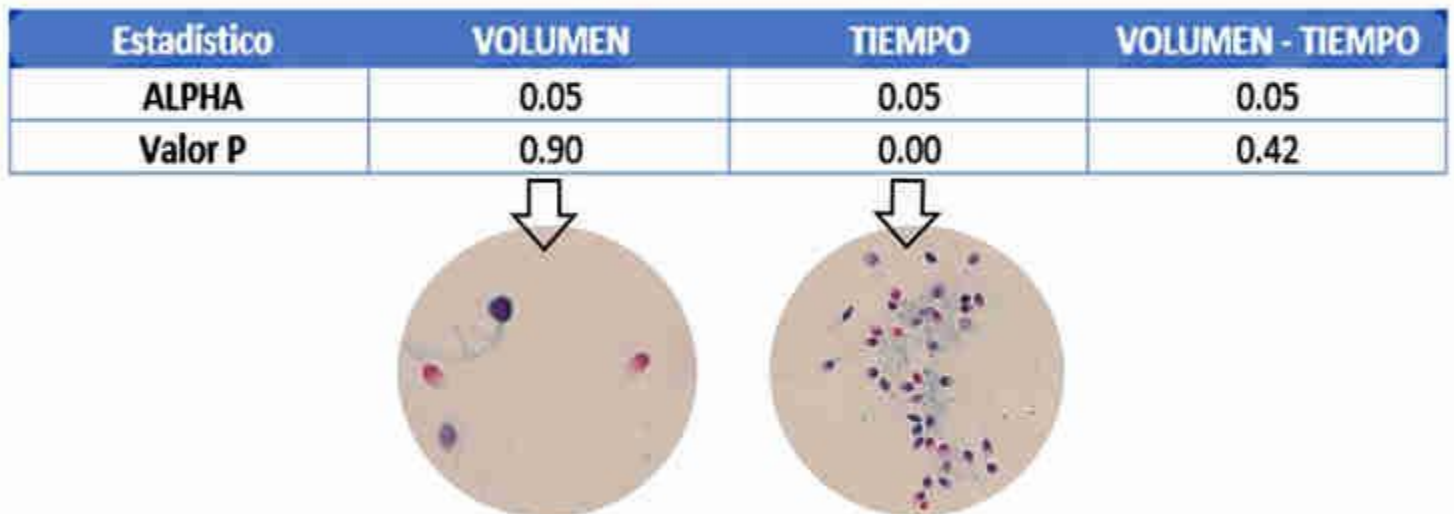
Esta interrogante se resuelve a partir de los resultados obtenidos, según figura 5, en la cual se puede observar como el P-valor es igual a 0.90, siendo este mayor al

valor Alpha, por lo tanto, las cantidades de volumen no influyen en la cantidad de cabezas de espermatozoides contadas.

¿El tiempo es el responsable de obtener un mayor conteo de espermatozoides?

Se realiza la misma mecánica, donde el P-valor para esta prueba es de 0,00, siendo este menor que el nivel de confianza establecido (valor alpha de 0,05), según la figura 5, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H0) y se acepta la H1. Por lo que se puede concluir que los niveles de tiempo de extracción si influyen en la cantidad de cabezas de espermatozoides contadas.

H0: Los niveles de tiempo no influyen en la cantidad de cabezas de semen contadas



H1: Los niveles de tiempo influyen en la cantidad de cabezas de semen contadas

Figura 5. Comportamiento estadístico en el conteo de espermatozoides.

¿Es realmente el tiempo el responsable de una mayor cantidad de conteo de espermatozoides?

Para terminar de confirmar y garantizar esta afirmación se realiza una prueba TUKEY, está prueba determina entre todos los valores obtenidos cuales tienen alguna similitud, siendo que los conteos entre 30 min y 2 horas tiene valores similares (123 y 153 espermatozoides respectivamente), no obstante, con el tiempo 12 horas el promedio es más alto (1041,76 espermatozoides), por lo podemos

concluir que a las 12 horas se tienen conteos de espermatozoides de hasta 10 veces mayores que con tiempos menores de extracción.

Como resultado del presente estudio se propone aumentar el tiempo de extracción de las muestras para observación microscópica por tinción de "Árbol de navidad" para aumentar en promedio la probabilidad de mayores conteos de espermatozoides en las muestras, mientras que tomar mayor volumen de muestra para la observación al microscopio no representa ninguna diferencia significativa de mayor número observable de espermatozoides.

