



**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO.
FACULTAD DE MEDICINA.
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA.**



“Mejoramiento del proceso de investigación confirmatorio de delitos sexuales, mediante la conjugación de Robótica, tecnología digital óptica y procedimientos bioquímicos en la unidad de Bioquímica y Criminalística del Servicio Médico Legal de Santiago”.

**Seminario de Grado
Presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y
Citodiagnóstico”.**

Autores:
Gabriela Méndez Espinoza
Carolina Villarroel Carvajal

Profesor Guía: Guy Neckelmann Muñoz.
Profesor Co-Guía: Francisco Méndez Fuentes.

2008

AGRADECIMIENTOS.

Queremos agradecer a Dios por guiarnos en este largo camino, otorgándonos la confianza, seguridad, paciencia y tolerancia para el logro de nuestros objetivos.

A nuestras familias por su constante e incondicional apoyo, y a las personas que desinteresadamente hicieron posible el desarrollo adecuado de nuestro Trabajo:

Sra. Ana Toyos, Químico Farmacéutico, Jefa Departamento de Laboratorios.

Sr. Guy Neckelmann, Bioquímico- Químico Farmacéutico y Jefe de la Unidad de Bioquímica y Criminalística.

Sr. Francisco Méndez, Químico Farmacéutico de la Unidad de Bioquímica y Criminalística.

Sr. Andrés Casanova, Químico Farmacéutico de la Unidad de Bioquímica y Criminalística.

Sra. Paola Leiva Márquez, Químico Farmacéutico de la Unidad de Bioquímica y Criminalística.

Sr. Peter Maccoll, Profesor de la cátedra de Metodología de la Investigación.

Sr. Sergio Ramos, Profesor a cargo de la cátedra de Metodología de la Investigación.

A todas estas personas muchas gracias de todo corazón.

*“Mientras los ríos corran al mar, hagan sombra a los valles los montes y haya
estrellas en el cielo, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre
agradecido”. Marón Publio Virgilio.*

A ti mi querida abuela, por inculcarme valores, fuerza y ganas de luchar por los sueños y metas que uno se propone. Por ser mi apoyo, mi alegría y mi guía, de donde quiera que estés, te agradezco cada día de mi vida por estar junto a mi tanto física como espiritualmente. Te amo
Carolina Villarroel Carvajal

RESUMEN

Debido a la dificultad e interferencia visual en la detección de cabezas de espermatozoides, que causan todas aquellas sustancias y estructuras que acompañan las muestras, contenidos vaginales y bucales, y que no son objeto de estudio (matrices), al problema característico que presentan los microscopios ópticos en relación con la profundidad de campo, se realizó un mejoramiento del proceso de investigación confirmatorio de delitos sexuales, utilizado en la unidad de Bioquímica y Criminalística del Servicio Médico Legal de Santiago. Este mejoramiento se consiguió, mediante la incorporación de tres nuevas aplicaciones: Robótica, Tecnología Digital Óptica y procedimientos bioquímicos (proteinasas K). La primera aplicación, tuvo como base un microscopio óptico con cámara digital incorporada, sobre el cual se construyó un Robot, que fue diseñado utilizando tres motores paso a paso que entregan precisión en los movimientos del microscopio en el eje X, Y y micrométrico, un microprocesador que emite los impulsos para el movimiento de los motores, y un software “Arduino pro 3.0” que comanda mediante una programación y dirige los movimientos de los motores en sus distintos ejes. El Robot cumple la función de tomar 3 fotografías del mismo campo, pero con distinto foco de un área representativa de la placa y almacenarlas dentro de una carpeta en el computador. La segunda aplicación, tecnología digital óptica Software “Helicon Focus 4.6”, apila las 3 fotos y genera una sola imagen, la que se encuentra totalmente enfocada, la cual finalmente será analizada en la pantalla del computador. La tercera aplicación, consistió en el tratamiento de los contenidos en estudio con proteinasa K, una enzima que es capaz de realizar una digestión diferencial de estructuras, conservando las cabezas de los espermatozoides, proporcionando un fondo mucho más limpio. La conjugación del Robot, tecnología digital óptica y la digestión con proteinasa K, permitieron un mejoramiento notable en la técnica utilizada, ya que consigue entre otras cosas: purificar los frotis, obtener fotografías de la placa en forma automática, solucionando los problemas de profundidades de campo presente en la observación microscópica, crear imágenes de buena calidad que permiten discriminar cabezas de espermatozoides, optimización del tiempo empleado en el proceso, mayor certeza en el diagnóstico.

Palabras clave: Robot, Tecnología digital óptica, Espermatozoides, Matrices, Proteinasas K.

ABSTRACT

Because of the difficulty and interference in the visual detection of sperm heads, causing all substances and structures that accompany the samples, vaginal and oral content, which are not covered by the study (masters), and the characteristic that presented the problem optical microscopes in relation to the depth of field, an improvement of the investigative process of confirming sexual crimes, used in the unity of Biochemistry and Criminalistics of the Forensic Medical Service in Santiago. This improvement was achieved through the incorporation of three new applications Robotics, Digital Optics Technology and biochemical procedures (proteinase K). The first application was based on an optical microscope with built-in digital camera, which had built a robot that was designed using three stepping motors that deliver precision movements of the microscope in the axis X, Y and micrometric, a microprocessor that emits pulses to the movement of the engines, software and a "pro Arduino 3.0" through a program that commands and directs the movements of the engines in their various axes. The Robot serves to take 3 photos of the same field, but with a different focus of a representative area of the plate and store them inside a folder on the computer. The second application, digital optics technology software Helicon Focus 4.6, "stacks the 3 photos and generates a single image, which is totally focused, which eventually will be analyzed on the screen of the computer. The third application, was to treat those in the study with proteinase K, an enzyme that is capable of making a differential digestion of structures, while retaining the head of the sperm, providing a much cleaner background. The combination of Robot, optics and digital technology digestion with Proteinase K, enabled a remarkable improvement in the technique used, as it gets among other things: purify smears, to get photographs of the board automatically solving problems depths This field in the microscopic observation, create good-quality images that allow discrimination of sperm heads, optimizing the time spent in the process, greater certainty in diagnosis.

Keywords: Robot, digital optics technology, Spermatozoa, Dies, Proteinase K.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS DE LA PROPUESTA.	6
2.1 Objetivo General.	6
2.2 Objetivos específicos	6
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.	7
3.1 Tipo de diseño.	7
3.1.1 Descripción de la Técnica a comparar.	7
3.2 Muestra.	8
3.3 Variables.	10
3.4 Criterios de Inclusión y Exclusión.	10
3.5 Procesos de estudio.	11
3.5.1 Digestión enzimática.	11
3.5.2 Tinción de espermatozoides.	12
3.5.3 Funciones del Robot.	12
3.5.4 Mejoramiento de la imagen.	14
3.6 Registro de Datos.	15
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.	16
4.1 Búsqueda manual de espermatozoides.	16
4.2 Búsqueda automática de espermatozoides.	17
4.3 Resultados Obtenidos	18

4.3.1 Tórula B- 6179	19
4.3.2 Tórula B- 6664	21
4.3.3 Tórula B- 7107	23
4.3.4 Tórula B- 7657	24
4.3.5 Tórula B- 8052	26
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.	28
CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN.	29
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.	31
CAPÍTULO 8: REFERENCIAS.	33
CAPÍTULO 9: ANEXOS.	35
A.- Caracteres de la esperma.	35
B.- Proteinasa k	37
C.- Diseño de portaobjetos	39
D.- Pruebas de certeza.	41
E.- Tinción Gram.	42
F.- Robot.	47
F.1 Motores paso a paso.	47
F.2 Descripción del Robot.	48

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Portaobjeto diseñado.	8
Figura 3.2 Esquema de la obtención de muestra.	8
Figura 3.3 Ecuación Tamaño de muestra.	9
Figura 3.4 Tórulas con contenido Vaginal y bucal.	10
Figura 3.5 Frotis sin y con Tratamiento con Proteinasa K.	11
Figura 3.6 Cabezas de Espermatozoides con tinción Gram.	12
Figura 3.7 Robot.	13
Figura 3.8 Microprocesador.	13
Figura 3.9 Esquema de Helicon Focus 4.6.	14
Tabla 3.10 Registro de Datos.	15

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1 Resultados Obtenidos	18
Muestra B- 6179 de contenido vaginal, positiva:	
Figura 4.2 Fotografías con distintos planos de enfoque.	19
Figura 4.3 Imagen enfocada a través de Helicon Focus 4.6.	20
Figura 4.4 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.	20
Muestra B- 6664 de contenido vaginal, positiva:	
Figura 4.5 Fotografías con distintos planos de enfoque.	21
Figura 4.6 Imagen enfocada a través de Helicon Focus 4.6.	21
Figura 4.7 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.	22
Muestra B- 7107 de contenido vaginal, positiva:	
Figura 4.8 Fotografías con distintos planos de enfoque.	23
Figura 4.9 Imagen enfocada a través de Helicon Focus 4.6.	23
Figura 4.10 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.	24
Muestra B- 7657 de contenido vaginal, positiva:	
Figura 4.11 Fotografías con distintos planos de enfoque.	24
Figura 4.12 Imagen enfocada a través de Helicon Focus 4.6.	25

Figura 4.13 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.	25
Muestra B- 8052 de contenido vaginal, positiva:	
Figura 4.14 Fotografías con distintos planos de enfoque.	26
Figura 4.15 Imagen enfocada a través de Helicon Focus 4.6.	26
Figura 4.16 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.	27
CAPÍTULO 9	
A. CARACTERES DE LA ESPERMA.	
Figura A.1 Esquema de la estructura del Espermatozoide.	37
C. DISEÑO PORTAOBJETOS.	
Figura C.1 Diseño de portaobjetos.	39
Figura C.2 Placa Final.	40
Figura C.3 Molde	40
E. TINCIÓN GRAM.	
Figura E.1 Espermatozoides con tinción Gram.	46
F. ROBOT	
Figura F.1 Motor Paso a paso.	47
Figura F.2 Microprocesador.	49
Figura F.3 Programa Arduino Pro 3.0	49
Figura F.4 Robot.	51

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

En el laboratorio de Bioquímica y Criminalística se realizan análisis físicos (microscopía), químicos y bioquímicos (análisis enzimáticos), de los indicios biológicos que se encuentran en distintas matrices, entendiéndose por éstas como soporte en donde se encuentra el líquido seminal (telas, pañales, toallas higiénicas, sangre, fecas, entre otros), con un objetivo criminalístico. La examinación científica de los indicios, esta dirigida principalmente al análisis del material existente en la víctima o en el sitio del suceso, y a la examinación de las ropas y objetos del sospechoso, para hallazgos de material característico de la escena o de la víctima.

La hipótesis base de la Criminalística es que el criminal, por muy inteligente que sea, siempre deja en el lugar del delito, algo que revela su presencia allí. [1]

El 90% de las muestras y/o evidencias son tomadas en el Servicio Médico Legal de la Región Metropolitana, principalmente en la unidad de Sexología Forense. Las variadas evidencias, tales como ropas, armas blancas, muestras de tejido, fluidos biológicos, entre otros, provienen principalmente de los departamentos de clínica, Tanatología, Sexología, fiscalías (gendarmería), juzgados de familia, policía y hospitales de Santiago y los Servicios Médicos Legales Regionales. [2]

En el año 2006 se efectuaron 1.800 casos con 7.510 peritajes, durante el año 2007, se realizaron 1550 casos con 6280 peritajes, entendiéndose por éste, examen o estudio que realiza el experto (perito) sobre el problema encomendado, para luego entregar el dictamen pericial con sujeción a lo dispuesto por la ley, en el área de Bioquímica y Criminalística del Servicio Médico Legal de Santiago. [3]

En el área de Bioquímica y Criminalística, el estudio de los espermatozoides es un hecho frecuente, se estima que el 10% a 15% aproximadamente del total de muestras que se reciben mensualmente en esta área, son informadas como positivas a la presencia de espermatozoides [2]. Es de suma importancia su investigación, dilucidación del hecho delictivo y diagnóstico para el discernimiento de problemas vinculados al Derecho Civil y

Derecho Penal, por tal razón es trascendental el desarrollo de peritajes óptimos y adecuados para un diagnóstico de certeza.

En el quehacer cotidiano de las actuaciones médico legales, con el fin de precisar o esclarecer los delitos sexuales, se realiza como prueba confirmatoria la búsqueda de espermatozoides en muestras y/o evidencias, tales como, hisopados genitales, paragenitales y extragenitales, así como también, manchas sospechosas de ser semen en prendas u otros soportes como por ejemplo condones, zapatos, sábanas, entre otros, destinadas para tal peritaje, mediante diversos procedimientos. Para ello, el personal especialista se encarga de realizar minuciosas valoraciones que contribuyan con diagnósticos de mayor certeza. Es así como se han ido aplicando y mejorando procesos y técnicas, a modo de facilitar, agilizar y hacer menos tedioso el trabajo diario, minimizando así, las probabilidades de error.

Para determinar la presencia de manchas en evidencias, se realizan pruebas de forma rutinaria, en donde primero se ilumina la prenda o especie con una lámpara azul (430-470 nm) con filtro naranja, lo que permite la visualización de manchas que poseen algún tipo de fluido biológico fluorescentes, pudiendo ser semen, fluido seminal, orina, sudor u otro. Luego, un trozo de la prenda se somete a una serie de reacciones que permiten identificar la presencia de semen específicamente, entre las cuales encontramos la reacción de fosfatasa ácida (reacción orientativa), Sirvaran & Bami (específica), microscopía (certeza), entre otras. [4]

La búsqueda de líquido espermático se relaciona con los delitos de estirpe sexual, en el caso de los hisopados, esta investigación se realiza en muestras obtenidas de la vagina, recto y cavidad oral, así como en aquellas zonas susceptibles de encontrar el mismo. Ésta no sólo confirma la acción sexual ejercida sino que confirma o descarta determinadas versiones sobre los hechos acontecidos.

El estudio de los frotis en los casos de presuntas víctimas de delitos sexuales, se encuentra circunscrito a la determinación citológica de la presencia o ausencia de espermatozoides procedentes de los indicios dejados en el sitio del suceso, sobre la víctima o el agresor, el que corresponde a fluidos biológicos, prendas de vestir, objetos, entre otros, como se hace referencia en párrafos anteriores. La investigación del semen, debido a

limitaciones en su desarrollo, puede presentar una serie de dificultades para su observación, retrasando así la obtención de resultados. Dentro de éstas encontramos: diferencia en el plano de enfoque que provoca el microscopio óptico en los campos visuales, contaminación de la muestra, la humedad e interferentes visuales que enmascaran a los espermatozoides y tiempo que transcurre desde que se produce el delito hasta la llegada de la muestra al servicio para sus valoraciones. El tiempo postcoito en el que se pueden encontrar espermatozoides en la cavidad vaginal, varía de unos autores a otros, aunque de todos modos cuanto más precozmente se proceda, mayores posibilidades de éxito habrá, por ejemplo, en el caso de la muerte homicida de una persona de sexo femenino, se hace preciso la investigación de carácter inmediato de la posibilidad de presencia de restos de líquido espermático, el dejar la toma de muestras para el acto de autopsia, sería perder un porcentaje de posibilidades de éxito importante. [13]

Es debido a estas limitaciones y al contexto en que se ven inmersos cada uno de los delitos, lo que lleva a agilizar y mejorar cada una de las pericias con el propósito de que se logren entregar informes adecuados, oportunos y que cumplan con resultados favorables en lo judicial. Por tales razones, en conjunto con profesionales del Servicio Médico Legal de Santiago, se ha querido perfeccionar la técnica existente, aplicando recursos tecnológicos poco utilizados en áreas médicas, pero si en otras disciplinas, con intención de mejorar la identificación y visualización de los espermatozoides, lo que permitirá realizar estudios de forma eficiente, eficaz y de mayor certeza diagnóstica.

Se puede señalar entonces, por los motivos expuestos con anterioridad, que los espermatozoides en materia de estudio, en la mayoría de los casos no se encuentran aislados, sino que se encuentran presentes en diferentes matrices, las cuales pueden enmascararlos dificultando así su estudio y posterior visualización, pudiendo crear de esta manera falsos negativos [11].

De acuerdo a estos antecedentes se plantea la siguiente pregunta de Investigación:

“¿Es posible mejorar la visualización de los espermatozoides, mediante la conjugación de Robótica, tecnología digital óptica y procedimientos bioquímicos?”.

El propósito de estudio es realizar una limpieza de las muestras altamente contaminadas, a fin de conseguir una placa que presente un fondo con la menor cantidad de estructuras no deseadas, con ello facilitar la visualización y permitir detectar las cabezas de espermatozoides sin mayores distractores. Se debe considerar la presencia de matrices, por tanto a todas las muestras de contenido vaginal y bucal, obtenidas para este estudio, que presenten altos niveles de contaminación, se les realizará una digestión enzimática parcial mediante proteinasa K (Ver Anexo B), la cual logra hacer una limpieza y disminuir considerablemente estructuras que causen interferencia visual, sin afectar a los espermatozoides. La proteinasa K fue incorporada el año 2006 en el Servicio Médico Legal de Santiago, siendo aplicada sólo a las muestras de contenido rectal, solucionando en parte las limitaciones ópticas que se presentaban al observador. Algunos autores, para este mismo procedimiento, mencionan la utilización de métodos como maceración simple, ácido sulfúrico 80%, entre otros, lo que de acuerdo a las experiencias de los profesionales del servicio, se consideran demasiado agresivas para la integridad y conservación de las cabezas de espermatozoides [1] (Ver Anexo D).

Para la visualización óptica de los espermatozoides se realizará la tinción de éstos con la técnica de Gram (Ver Anexo E), la cual ha sido mejorada y estandarizada llegando a la obtención de resultados óptimos necesarios para el estudio, otros autores utilizan técnicas de tinción como la de Papanicolaou, Hematoxilina Eosina, May-Grumwald-Giemsa, pero a diferencia de éstas, la tinción Gram es una técnica simple, rápida y que además cumple con los requisitos necesarios para el fin que se persigue, la observación de espermatozoides [1], [5], [6].

Se procederá luego, a capturar fotografías de forma automática de un número representativo de campos visuales (parte del espacio que el objetivo del microscopio es capaz de captar) de los frotis coloreados con la técnica de Gram, mediante un Robot (Ver Anexo F), el cual es una modificación de un microscopio óptico con adaptador de cámara fotográfica, al cual se le ha incorporado 3 motores paso a paso, mecanismos de control del movimiento, un disparador remoto de cámara fotográfica, un cargador de batería de cámara fotográfica permanente y un microprocesador capaz de seguir instrucciones comandadas por un software desde un computador. Las fotografías obtenidas, serán procesadas con un

programa computacional, Helicón Focus 4.6, el cual es capaz de procesar múltiples fotografías en un escenario con un alto contraste dentro de una única imagen, por tanto, mejora considerablemente la imagen en cuanto al enfoque, solucionando así el problema que presentan los microscopios ópticos causado por los distintos planos de enfoque que tienen las estructuras que se encuentran en la muestra, y que el observador debe resolver regulando el micrométrico cada vez que se avanza o retrocede en un campo visual, para conseguir una imagen nítida.

CAPÍTULO 2: OBJETIVO (S) DEL PROYECTO.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

- Mejorar visualización de los espermatozoides, usando para ello tres procedimientos, Robótica, tecnología digital óptica y reacciones bioquímicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Mejorar la calidad de la limpieza mediante procedimientos bioquímicos.
- Incorporar el uso de visualización digital de espermatozoides, mediante el empleo de un Robot para la captura de imágenes y un software de mejoramiento de imágenes.
- Disminuir los tiempos de análisis de los frotis.
- Redefinir protocolo de técnica existente.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 TIPO DE DISEÑO.

Se realizará un estudio de tipo experimental, para evaluar la efectividad del uso de un Robot y tecnología digital óptica (Ver anexo F), en comparación con el método manual (utilizado actualmente) para la detección de espermatozoides.

3.1.1 Descripción de la técnica a comparar.

El grupo control es el grupo de muestras a las que manualmente se realizará la búsqueda de espermatozoides y el grupo experimental, serán las mismas muestras a las cuales se les tomarán fotografías de forma automática campo por campo (utilizando la captura de imágenes mediante el Robot), obteniendo un set de imágenes que serán procesadas con el software Helicon Focus 4.6 y posteriormente, se les realizará la búsqueda de espermatozoides, en el monitor del computador. Se pretende evaluar la presencia o ausencia de espermatozoides en los diferentes extendidos de contenidos vaginales y bucales, para comprobar efectividad del Robot y tecnología digital óptica.

Las muestra con propósito de estudio, se colocarán en portaobjetos especialmente diseñados (Ver anexo C), que se han divididos en celdas con el propósito de que queden delimitados y no escurra la solución, de tal manera que la muestra ocupe una posición y área constante. Esta delimitación es de vital importancia para programar el Robot, ya que permitirá establecer los parámetros exactos de los movimientos que éste deberá realizar. Además permiten realizar el análisis de varias muestras a la vez, ya que en cada una de las tres celdas, irá una muestra distinta.

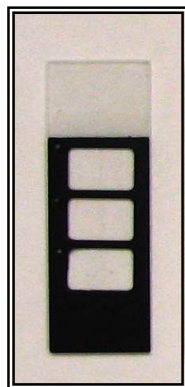


FIGURA 3.1 Portaobjeto diseñado para evaluar el Robot.

3.2 MUESTRA.

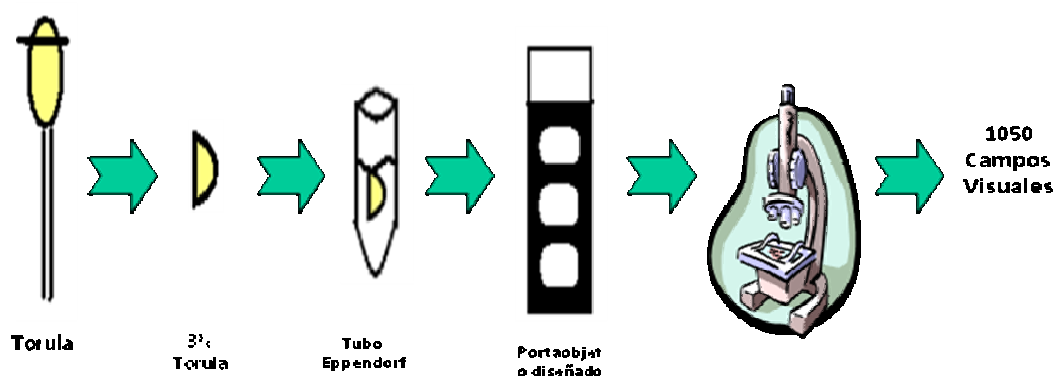


FIGURA 3.2 Esquema de la obtención de la muestra de estudio.

Se utilizarán 7 tómulas en total, de muestras de contenidos tanto bucales como vaginales de delitos sexuales del área de Bioquímica y Criminalística del Servicio Médico Legal de Santiago, éstas son elegidas al azar, pueden ser tanto positivas como negativas a la presencia de espermatozoides, esto permite dar un valor diagnóstico de mayor certeza, debido a que se puede discernir si el Robot y el software, capturan imágenes positivas reales de cabezas de espermatozoides o crea falsos positivos o negativos de estructuras semejantes a éstos.

De estas tómulas se ocupará el 3% de cada una con propósito de estudio microscópico. La unidad de estudio, corresponde al número de campos visuales por muestra que se pueden observar bajo microscopio con un aumento de 400x (objetivo 40x por Ocular 10x), este valor corresponde a un total de 1050 campos visuales, número que contiene cada una de las celdas del portaobjeto delimitado y que fueron contabilizados en forma manual.

Para obtener el tamaño de muestra representativa y de validez con propósito de análisis se utilizará la siguiente fórmula [14]:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha}^2 \cdot p \cdot q}{d^2}$$

FIGURA 3.3 Ecuación tamaño de muestra.

En donde:

- $Z_{1-\alpha}^2$: Valor Z de una confianza de 1-a.
p : Es la proporción esperada
d : Es el error de estimación
q : 1-p

Por tanto, considerando que la unidad de estudio de una muestra equivale a 1.050 campos visuales, en donde Z es de un 95%(1.96), p es de un 0.5 (50%) y el error de muestra es de 0.05 (5%), el tamaño muestral corresponde a 384.16 campos visuales para propósito de estudio.



FIGURA 3.4 Tórulas con contenido vaginal y Bucal.

3.3 VARIABLES.

- *Variables independientes:*
 - Búsqueda manual de espermatozoides.
 - Búsqueda de espermatozoides en imágenes obtenidas con el Robot y procesadas con el software, Helicon Focus 4.6.
- *Variables dependientes:*
 - Identificación de presencia o ausencia de espermatozoides en muestras experimentales (automatizador) versus muestras control (manuales).

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

- **Inclusión:** Tórulas con contenido Vaginal y Bucales.
- **Exclusión:** Prendas (ropas, zapatos, etc), contenidos rectales.

3.5 PROCESOS DE ESTUDIO.

3.5.1 Digestión enzimática.

Se realizará una digestión enzimática con proteínasa K a las muestras de contenido con propósito de estudio (vaginales y bucales), que a simple vista muestren un alto nivel de contaminación (hemorrágicas, con tierra, arena, entre otros.) con la finalidad de eliminar proteínas solubles que se encuentren junto a los espermatozoides, de manera de facilitar la determinación de éstos a través de la observación de imágenes digitales. Esto se logra debido a la particularidad que tienen las cabezas de espermatozoides a resistir a la digestión con esta enzima. Este tipo particular de extracción se conoce como lisis diferencial (Ver Anexo B).

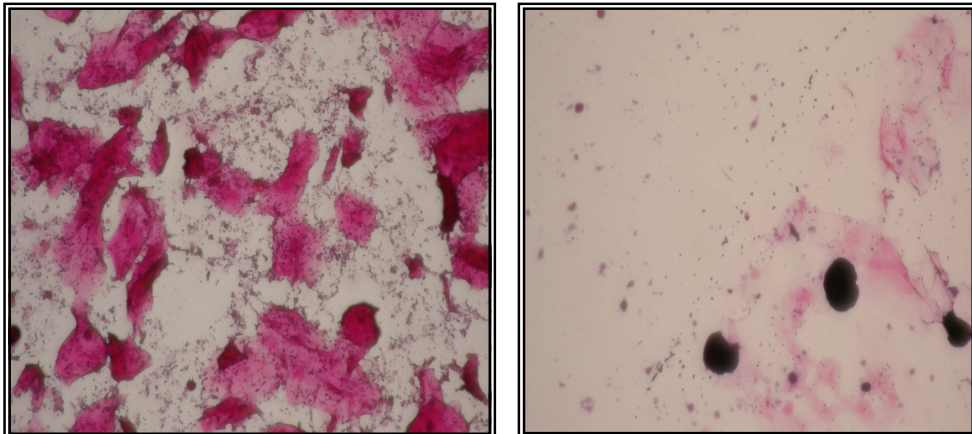


FIGURA 3.5 Izquierda Frotis sin tratamiento con Proteínasa K; Derecha Frotis con tratamiento con Proteínasa K.

3.5.2 Tinción de espermatozoides.

Se realizará la coloración de espermatozoides, mediante la técnica de Gram utilizada de forma rutinaria en el Servicio Médico Legal de Santiago, esto permitirá visualizar la cabeza de los espermatozoides de un color rosado/violeta con fondo rosado tenue. (Ver anexo E).

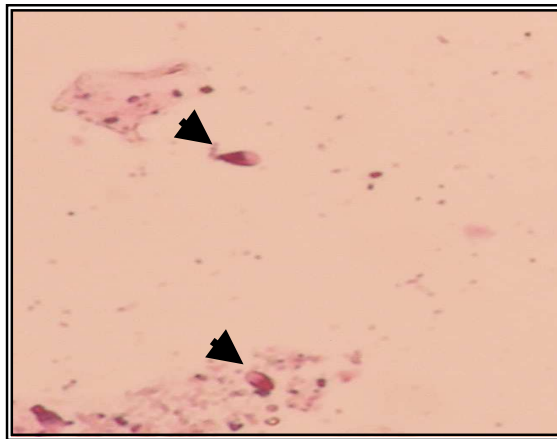


FIGURA 3.6 Cabezas de espermatozoides con tinción Gram (Flechas Negras).

3.5.3 Funciones del Robot.

Se adaptarán a un microscopio óptico (Olimpus CX31) con dispositivo de cámara fotográfica, tres motores paso a paso. Este tipo de motores tiene como característica su gran precisión de giro, además soluciona problemas que poseen otros tipos de motores como lo es la inercia mecánica y la dificultad para controlar la velocidad. Dos de los motores permitirán el movimiento en el plano del eje X e Y de la platina, y un tercero que regulará el enfoque, modificando el micrométrico del microscopio. En el dispositivo de cámara fotográfica del microscopio, se conectará una cámara digital (Canon EOS digital Rebel XT_i, 10Mpixel), la cual mediante un disparador remoto, ira sacando fotos campo por

campo de forma automática en 3 focos distintos, pero constantes en términos de estudio. Las 3 fotografías obtenidas por campo, serán almacenadas en una carpeta creada en el computador. Todas estas funciones serán comandadas desde un microprocesador, Arduino USB Board decimilla, al cual se le han programado cada una de las direcciones, pasos de corriente y tiempos mediante el software de programación, Arduino Pro 3.0. Este Robot será aplicado al grupo experimental con propósito de evaluar la presencia o ausencia de espermatozoides en relación con el grupo control.

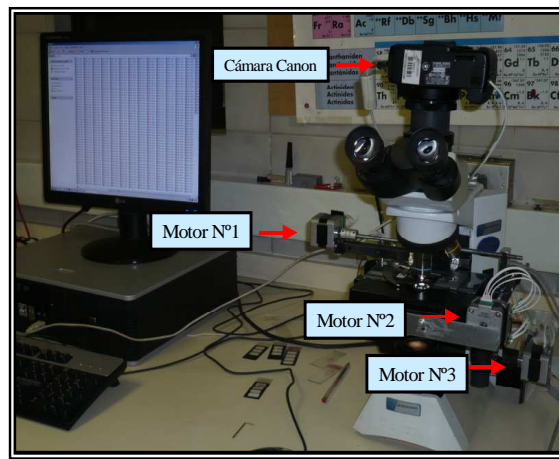


FIGURA 3.7: Robot. Motor N°1: permite realizar movimientos en el plano X; Motor N°2: permite realizar movimientos en el plano Y; Motor N°3: permite el movimiento del micrométrico.

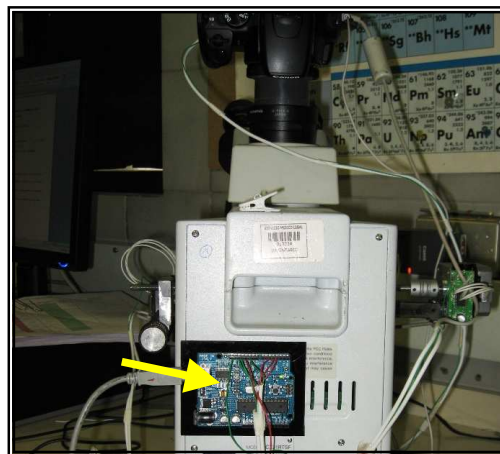


FIGURA 3.8: Microprocesador Arduino USB Board decimilla (flecha amarilla).

3.5.4 Mejoramiento de la imagen.

Mediante la utilización del Robot, al cual se le han programado las distintas funciones que se necesitan para la captura de imágenes, se tomarán 3 fotografías secuenciales por campo de la placa, modificando levemente el enfoque de cada una de ellas, y se procesarán con el software “Helicon Focus 4.6”, éste es un programa que crea una imagen perfectamente enfocada de varias imágenes parcialmente enfocadas. El programa está diseñado para el proceso de imagen óptica del microscopio, de manera de hacer frente al problema de la profundidad de campo, limitante característica de los microscopios. El programa puede ajustar y clasificar automáticamente las imágenes, al combinar la imagen perfectamente enfocada. (Ver anexo G).

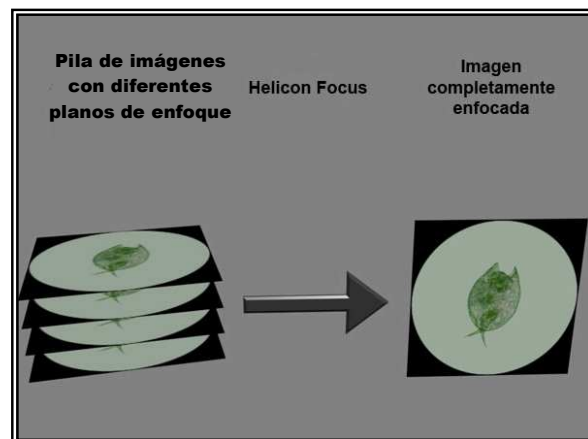


FIGURA 3.9 Esquema del procesamiento de imágenes mediante Helicon Focus 4.6”.

El software Helicón Focus 4.6, tomará las 3 fotografías con distinto foco (correspondientes a un campo de la placa) desde la carpeta que las contiene, y mediante la superposición de éstas mejorará el enfoque, creando una imagen nítida para la búsqueda de cabezas de espermatozoides. Una vez obtenidas las imágenes mejoradas, éstas son enviadas a una carpeta final, en donde se almacenan todas las imágenes procesadas.

3.6 REGISTRO DE DATOS.

Para registrar la información obtenida de los procesos a comparar, se utilizará una ficha que contendrá los siguientes Datos:

TABLA 3.10 Ficha de registro de datos. El diagnóstico automático corresponde a la determinación de espermatozoides mediante la observación de las imágenes obtenidas a través del uso del Robot y el software Helicón Focus 4.6. El diagnóstico Manual es el que se realiza de forma rutinaria en la Unidad.

Nº de Tórula	Contenido	Tratamiento con Proteinasa K (PK).	Diagnóstico Manual	Diagnóstico Automático

CAPÍTULO 4: RESULTADOS.

Detección de la presencia de cabezas de espermatozoides en imágenes capturadas con un Robot y procesadas con tecnología digital óptica, que logren resolver dudas sobre estructuras similares a éstos, a partir de muestras tratadas con proteinasa K (en el caso de que estén muy contaminadas). Lograr purificar los frotis mediante la limpieza con la digestión enzimática, obtener imágenes en forma automática, de buena calidad y a gran velocidad, de manera que la observación de las imágenes obtenidas facilite el trabajo del equipo profesional.

4.1 BÚSQUEDA DE ESPERMATOZOIDEOS MANUAL:

El sistema para la detección de espermatozoides que ha adoptado hasta estos días el Servicio Médico Legal de Santiago, consiste en la revisión microscópica y movimiento manual del portaobjetos de los frotis obtenidos de hisopados bucales, rectales y vaginales que llegan hasta la unidad para su análisis, aplicando una digestión enzimática solo a los hisopados de origen rectal, los cuales son luego teñidos con la técnica de Gram. Los profesionales se enfrentan a una diversidad de estructuras teñidas de coloración fucsia y violeta, que no corresponden exclusivamente a su prioridad de estudio que son los espermatozoides, sobre todo si la muestra presenta alta contaminación visual como ocurre en los contenidos vaginales hemorrágicos y rectales, donde encontramos gran presencia de glóbulos rojos y flora bacteriana respectivamente. Debido a lo mencionado, las dificultades que presenta la localización de espermatozoides con el método empleado hasta el momento son muchas, pudiendo mencionar entre ellas:

- Fatiga visual del observador
- Enmascaramiento de los espermatozoides por estructuras de mayor tamaño.

- Confusión de espermatozoides con artefactos de características similares.
- Tiempos prolongados para realizar la búsqueda y confirmación.

Como se puede apreciar, el método manual si bien es una buena opción, está sujeto a una serie de problemas que puede llevar a dificultades en el diagnóstico. Mediante el estudio con el Robot y tecnología digital óptica se logró disminuir todas estas dificultades, para lo cual se mencionarán a continuación todas aquellas ventajas que se consiguieron al incorporar este nuevo sistema.

4.2 BÚSQUEDA DE ESPERMATOZOIDEOS CON IMÁGENES OBTENIDAS AUTOMÁTICAMENTE:

Utilizando las mismas muestras, pero aplicando una digestión con proteinasa K a las muestras de estudio más contaminadas, sin modificar la tinción que se emplea actualmente, el Robot fotografiará un número representativo de campos de la placa, archivándolas en una carpeta del computador que se usa como controlador. Posteriormente, las imágenes obtenidas, se procesan con el software Helicón Focus 4.6, mejorando la calidad de imagen en cuanto al enfoque, permitiendo así detectar en las imágenes digitales obtenidas, cabezas de espermatozoides. Esto llevará a conseguir entre otras cosas:

- Mayor aumento de las estructuras presentes en los frotis, en comparación con la que nos ofrece el método manual.
- Optimizar el tiempo del profesional, ya que permitirá que mientras se tomen las fotografías en forma automática a través del Robot, éste realice otras actividades en forma paralela.
- Mayor certeza en determinar la existencia de espermatozoides, mediante revisión fotográfica y en último término, en caso de duda, existe la opción de ubicar con exactitud el campo donde aparece la estructura sospechosa para un tercer análisis.

- Evita la fatiga visual del profesional a cargo de realizar la búsqueda.
- Analizar desde cualquier computador las fotografías obtenidas, permitiendo que el microscopio siga funcionando de forma automática con otras muestras.
- Mantener el foco durante el proceso de toma de fotografías, gracias a la precisión de los motores y la aplicación del software Helicón Focus 4.6.

4.3 RESULTADOS OBTENIDOS

TABLA 4.1 Resultados obtenidos. +: Positivo, -: Negativo; √: con PK, X: sin PK.

Nº de Tórula	Contenido	Proteinasa K (PK).	Diagnóstico Manual	Diagnóstico Automático
<i>B- 6179</i>	<i>Vaginal</i>	X	+	+
<i>B- 6664</i>	<i>Vaginal</i>	X	+	+
<i>B- 7105</i>	<i>Bucal</i>	X	-	-
<i>B- 7107</i>	<i>Vaginal</i>	X	+	+
<i>B- 7109</i>	<i>Bucal</i>	X	-	-
<i>B- 7657</i>	<i>Vaginal</i>	X	+	+
<i>B- 8052</i>	<i>Vaginal</i>	√	+	+

4.3.1 Tórula N° B- 6179. Positiva.

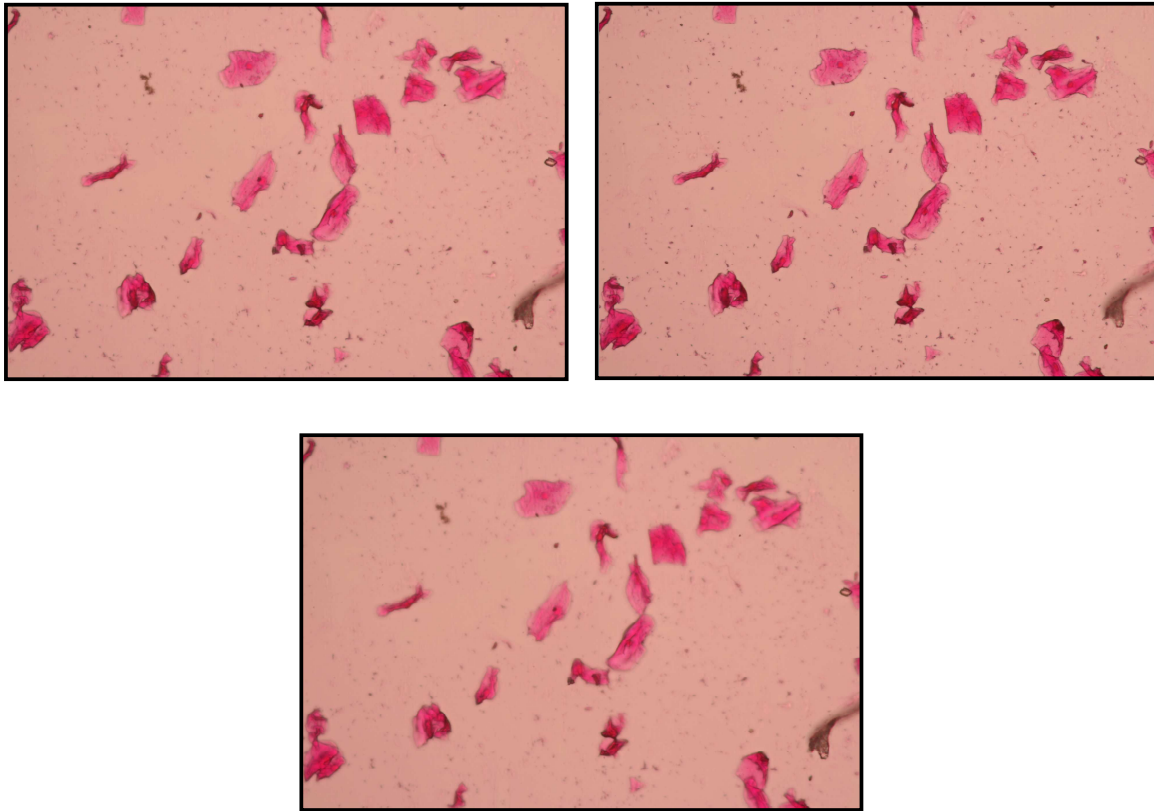


FIGURA 4.2 Fotografías de muestra N°6179 de contenido vaginal positiva, obtenidas automáticamente a través del Robot, en tres focos distintos.

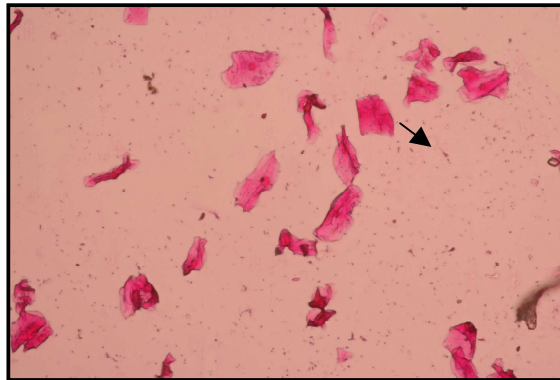


FIGURA 4.3 Fotografía enfocada a partir de las imágenes obtenidas en tres focos distintos. Esto se logra a través del software Helicón Focus 4.6. Espermatzoide (Flecha Negra)

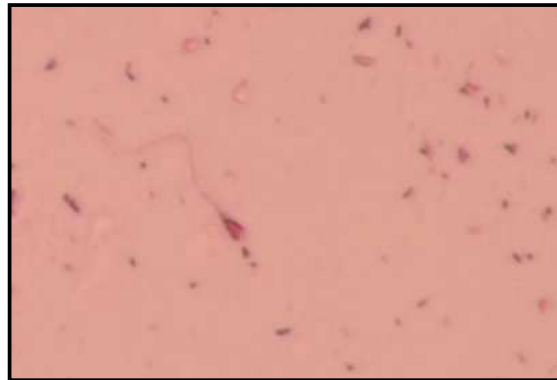


FIGURA 4.4 Aumento del sector con presencia de espermatzoide.

4.3.2 Tórula N° B- 6664. Positiva.

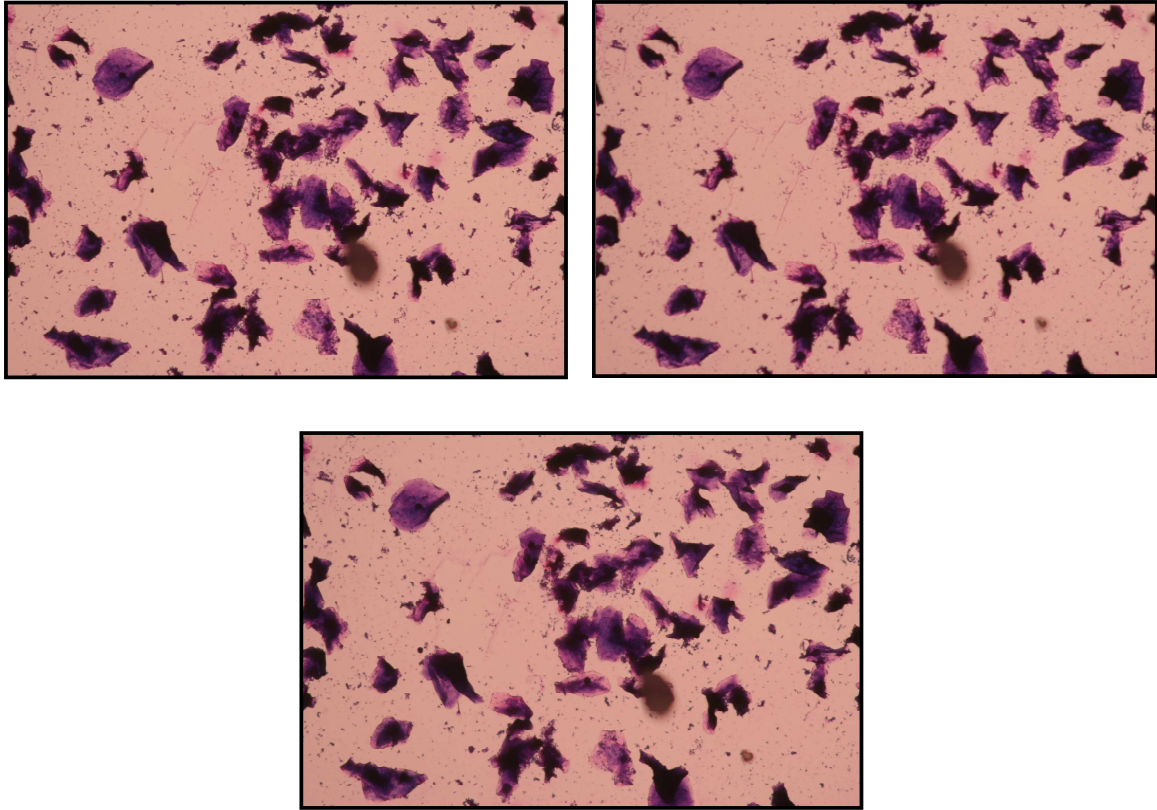


FIGURA 4.5 Fotografías de muestra N°6664, de contenido vaginal positiva, obtenidas automáticamente a través del Robot, en tres focos distintos.

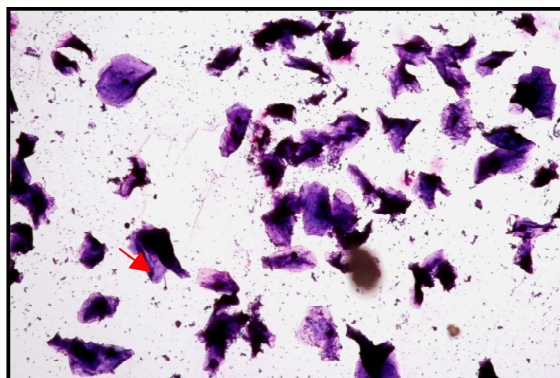


FIGURA 4.6 Fotografía enfocada a partir de las imágenes obtenidas en tres focos distintos. Espermatzoide (Flecha roja).



FIGURA 4.7 Aumento del sector con presencia de espermatozoide.

4.3.3 Tórula N° B- 7107. Positiva.

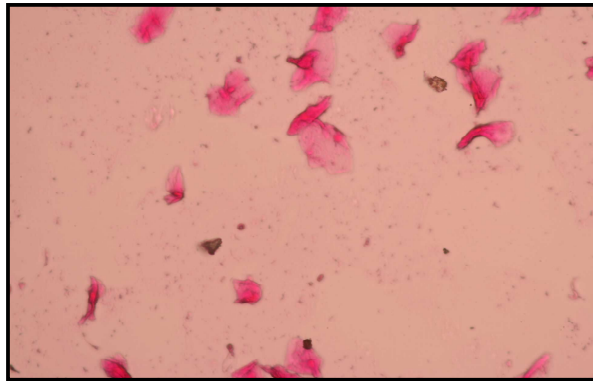
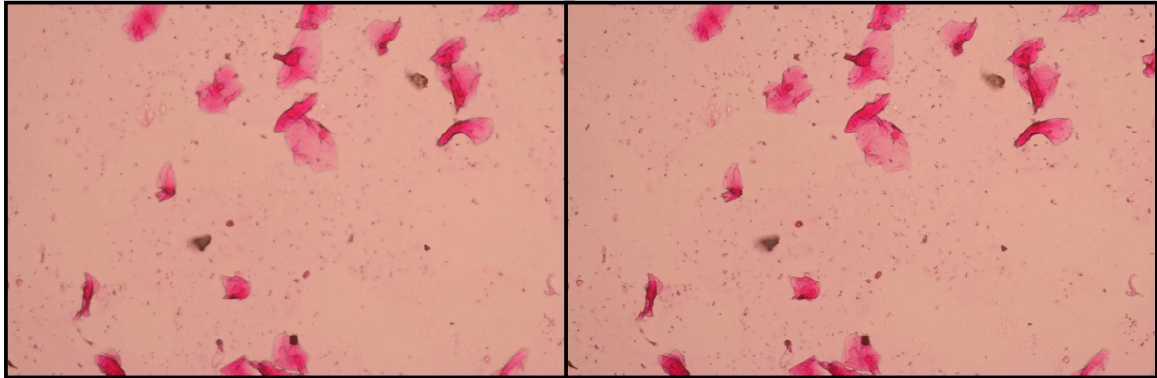


FIGURA 4.8 Fotografías de muestra N° 7107, de contenido vaginal positiva, obtenidas automáticamente a través del Robot, en tres focos distintos.

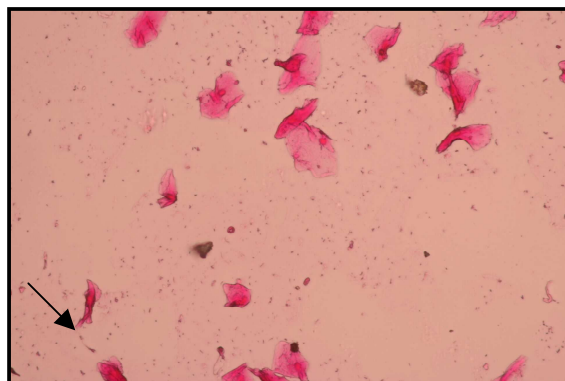


FIGURA 4.9 Fotografía a partir de las imágenes obtenidas en tres focos distintos. Espermatozoide (Flecha Negra)



FIGURA 4.10 Aumento del sector con presencia de espermatozoide.

4.3.4 Tórula N° B- 7657. Positiva.

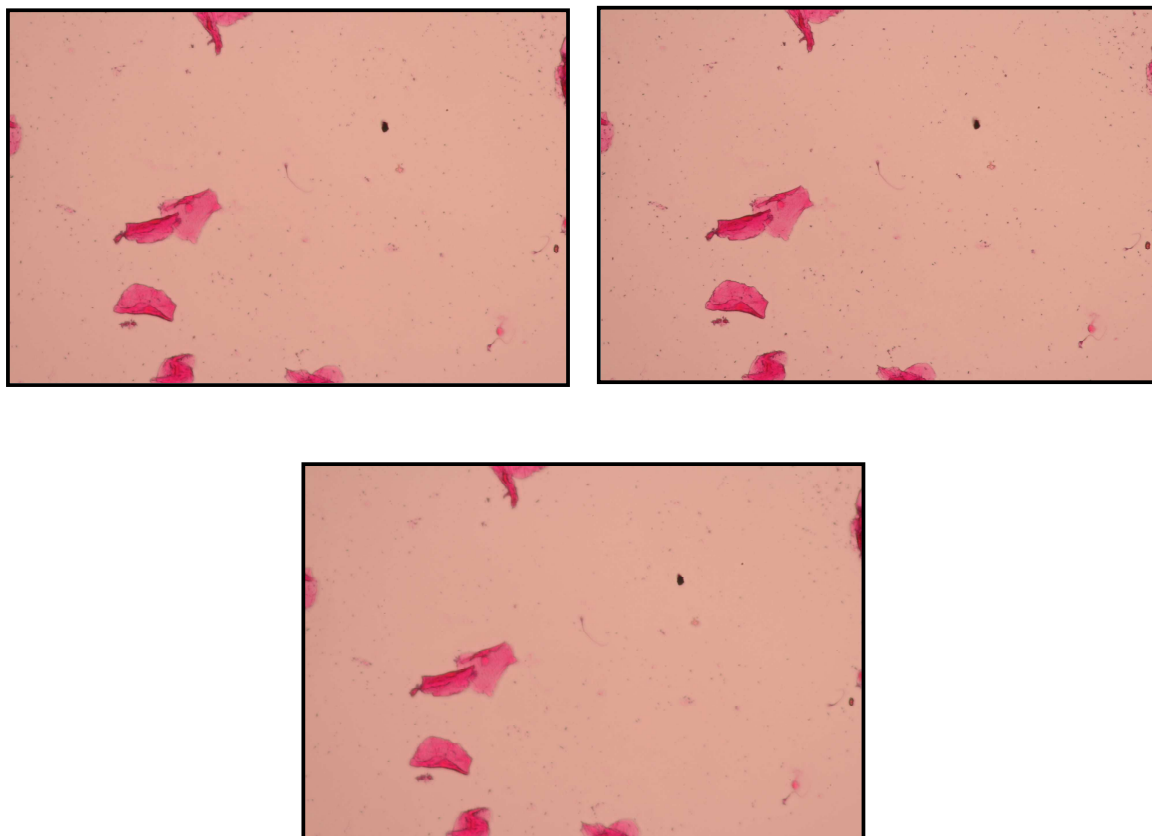
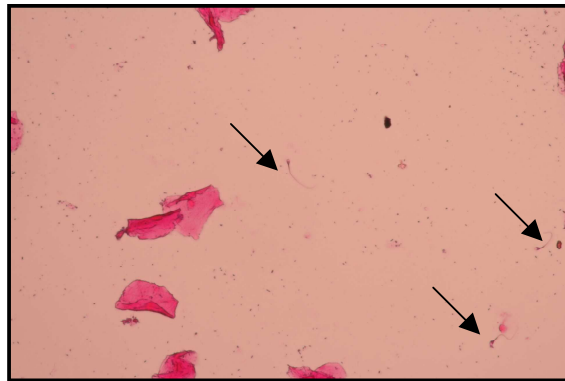


FIGURA 4.11 Fotografías de muestra N° 7657, de contenido vaginal positiva, obtenidas automáticamente a través del Robot, en tres focos distintos.



*FIGURA 4.12 Fotografía a partir de las imágenes obtenidas en tres focos distintos.
Espermatozoides (Flecha Negra)*

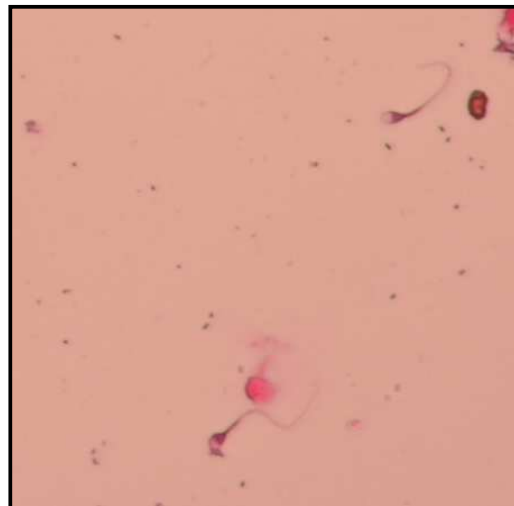


FIGURA 4.13 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.

4.3.5 Tórula N° B- 8052. Positiva.

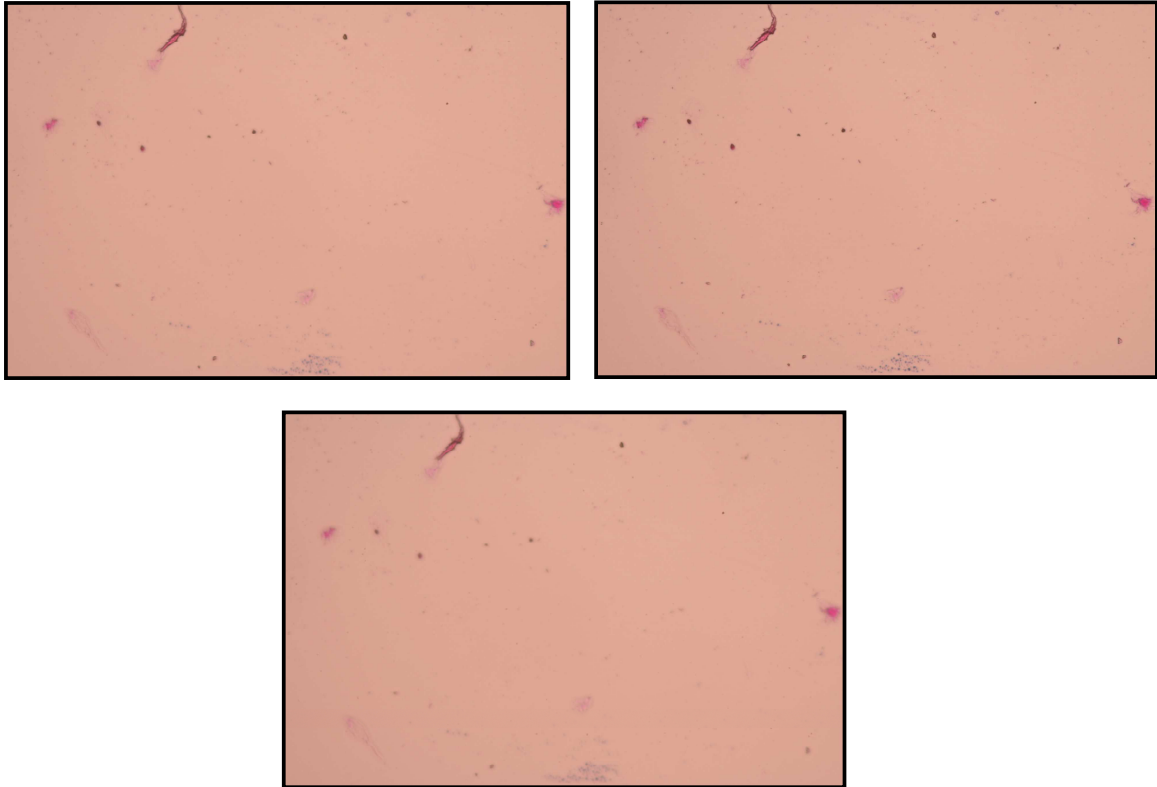


FIGURA 4.14 Fotografías de muestra N° 8052, de contenido vaginal tratada con proteinasa K, positiva. Obtenidas automáticamente a través del Robot, en tres focos distintos.

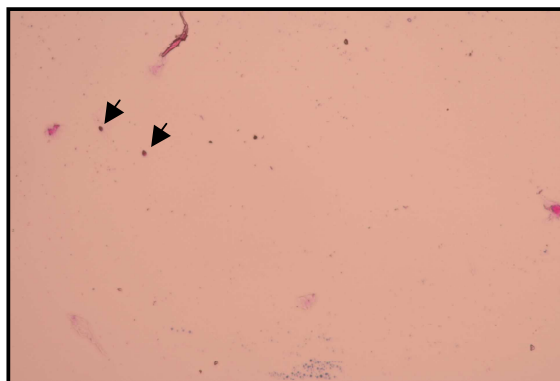


FIGURA 4.15 Fotografía a partir de las imágenes obtenidas en tres focos distintos. Espermatozoides (Flecha Negra)



FIGURA 4.16 Aumento del sector con presencia de espermatozoides.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Es preciso mencionar que con la digestión con proteinasa K se elimina una considerable cantidad de proteínas solubles que dificultan la observación de los espermatozoides. Sin embargo, la presencia de bacterias no logra ser eliminada completamente con este tipo de digestión, sobre todo en contenidos que están altamente contaminados, perdurando la limitación visual que provoca su existencia. Si bien este problema requiere de estudios posteriores más minuciosos, la digestión con esta proteína en contenidos, tanto bucales como vaginales contaminados en menor proporción en relación con los rectales, permite en gran medida la limpieza parcial de las muestras, lo que facilita significativamente la observación del contenido en cuestión, aplicando el software.

La protocolización de procesos como la tinción de Gram y un adecuado manejo de las muestras, ayuda con la apropiada funcionalidad del Robot y de la tecnología digital óptica empleada, ya que confiere homogeneidad en los frotis en cuanto a la distribución de los espermatozoides y aglutinación de las estructuras celulares. La estandarización de los distintos procedimientos, además de hacer reproducibles los resultados más óptimos en las distintas muestras, permite un adiestramiento visual del observador, logrando una rápida y certera ubicación de las cabezas de espermatozoides por sus características morfológicas y tintoriales (bitonalidad, forma, birrefringencia, reborde del acrosoma, etc.), descartando en forma paralela aquellas estructuras que no lo son. Estas condicionantes, como complemento, juegan un rol importante en el mejoramiento de la de visualización de cabezas de espermatozoides. Sin embargo es importante considerar además, la experticia, capacidad y destreza de cada observador.

Si bien los tiempos del proceso confirmatorio de presencia de espermatozoides no lograron reducirse considerablemente, se logro una optimización de éstos, en cuanto a que los profesionales a cargo de realizar la búsqueda disponen del tiempo en que el Robot ejecuta la toma de imágenes, en efectuar las otras técnicas complementarias para el esclarecimiento del peritaje.

CAPÍTULO 6: CONCLUSION.

Luego de realizar el estudio experimental consistente en comparar los resultados en la detección de espermatozoides, mediante el método manual utilizado en el Servicio Médico Legal de Santiago y el nuevo método de análisis de fotografías digitales automatizadas, podemos concluir lo siguiente:

- El diagnóstico Manual como el diagnóstico de las imágenes obtenidas desde el Robot y mejoradas con el Software Helicón Focus 4.6, concuerdan en los mismos resultados, por tanto, las imágenes logradas se pueden utilizar para la determinación de cabezas de espermatozoides, debido a que tienen validez y certeza diagnóstica.
- La utilización de la enzima Proteinasa K en contenidos vaginales y bucales altamente contaminados, permite obtener un fondo considerablemente más limpio, lo que beneficia el análisis de las imágenes ulteriores a la aplicación del software Helicon Focus 4.6.
- La calidad de las imágenes obtenidas en forma automática y su posterior procesamiento con el software Helicon Focus 4.6, permiten diferenciar estructuras similares a cabezas de espermatozoides, lo que otorga a este nuevo proceso una gran validez, al consentir la discriminación de estructuras que al ser visualizadas directamente en el microscopio, en forma manual, tenían una apariencia muy similar a la de los espermatozoides, pero que bajo observación de las imágenes digitales se estima claramente su equívoca apreciación.
- El proceso de determinación de cabezas de espermatozoides mediante la captura y procesamiento de imágenes, permite un mejoramiento ergonómico al reducir las horas frente al microscopio, lo que contribuye a que los profesionales eviten posturas inadecuadas que puedan provocar malestares físicos.
- Debido a la versatilidad del Robot, éste puede ser utilizado en otras materias y/o disciplinas con fines de estudio similares o distintos. Lo substancial es que su confección, bases y principios de funcionamiento ya están establecidos, y su modificación depende

únicamente del tipo de estudio, del sentido de la investigación que se le quiera dar y del desarrollo tecnológico que pueda venir en el futuro.

- La captura automática de imágenes, permite crear un registro de fotos de las muestras observadas, dando la opción de elegir la imagen a presentar en los tribunales de justicia.
- Las imágenes capturadas pueden ser vistas desde cualquier computador, mientras el Robot sigue capturando fotografías de otras muestras de forma automática, lo cual lleva a que el investigador realice la determinación de espermatozoides desde otro computador, sin interferir en el trabajo expedito realizado por el robot, permitiendo así la disposición de equipos y comodidad de los observadores.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.

- GISBERT CALABUIG J.A. (1998). *Medicina Legal y Toxicología*. 5ª Edición, Saber, Valencia.
- ALAN JUN. (2006). *Essential Forensic Biology*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. 305p.
- WILLIAM GOODWIN, ADRIAN LINACRE, SIBTE HADI. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. 170p.
- JOSÉ LUQUE CABRERA, MIGUEL ÁNGEL HERRÁEZ, ÁNGEL HERRÁEZ SÁNCHEZ, (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier, España.
- RAIMUNDO GARCÍA DEL MORAL. *Manual de Laboratorio Clínico Diagnóstico Anatomía Patológica*. Mc Graw Hill Interamericana. Colombia.
- DR. DAVID MONTOYA et al. (2004) *Peritaje Médico Legal en delitos sexuales: una pauta práctica para su correcta realización*. Revista Chilena Obstétrica-Ginecológica, 69(1):55-59.
- RODRIGO URREGO, ZOOT, MS; MARTHA OLIVERA ÁNGEL, MV, DR. SCI. AGR. OMAR CAMARGO, MVZ, MS. (2008). *Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides Bovinos*. Revista Colombiana de ciencias pecuarias. Febrero, 8 p.
- LIC. LOURDES MARÍA VEGA SOMONTE, DRA. DAISY FERRER MARRERO, (2005). “*Alternativas para la tinción y diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide*” Instituto de Medicina Legal. Ciudad de la Habana. CUBA. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Octubre, 12 p.

- VICTORIA PRIETO RUIZ CANELA. (2003). “*Estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de biología*”. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses Departamento de Sevilla.1-15, 4119p.
- DR. EDUARDO PÉREZ CAMPOS. *Centro de investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina*. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, México.
- EBELING, W., ET AL. (1974) *Proteinase K from Tritirachium album limber*. Eur. J. Biochem.
- TEKE SCHLICHT A.(2005). *Medicina Legal y Criminalística*. 377p.
- NATALIA MUÑOZ BARRERA. (2005). “*Determinación de parámetros fisicoquímicos de técnicas utilizadas en pericias bioquímicas de delitos sexuales*”. 63p.
- GABRIEL MAYORAL ANDRADE Y COLS. (2006). “*Identificación forense de fluido seminal*”. *Laborat-acta* 18:43-6. Volumen 18, número 2, 46 p.
- Servicio Médico Legal de Santiago.
- MAURICIO HERNÁNDEZ AVILA. (2000). *Diseños de estudios epidemiológicos*. Salud pública de México, Vol.2, N°2, marzo-abril.
- RAFAEL ALCARAZ MANZANO MÉDICO FORENSE. (2007). *Criminalística y escena de la muerte*. Publicado el 2 de junio, www.experticia.net, laboratorio de inteligencia e ingeniería documental.
- GLENN D. ISRAEL. (1992). *Determining Sample Size*. University of Florida, IFAS Extension. 5p.
- LIC. LUIS ALFREDO ALARCÓN FLORES. (2007). *Prueba pericial*. www.criminalistica.com.mx y www.criminalistic.org, página de Criminalística de México. Publicado viernes 12 Enero.
- www.wikipedia.org/wiki/Proteinase_K.

- www.danival.org/notasmicro/tincion/_madre_tincion.html.
- Helicon Focus Tutorial.

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS.

- [1] GISBERT CALABUIG J.A. (1998). *Medicina Legal y Toxicología*. 5ª Edición, Saber, Valencia.
- [2] Servicio Médico Legal de Santiago.
- [3] LIC. LUIS ALFREDO ALARCÓN FLORES. (2007). *Prueba pericial*.
- [4] NATALIA MUÑOZ BARRERA. (2005). “*Determinación de parámetros fisicoquímicos de técnicas utilizadas en pericias bioquímicas de delitos sexuales*”.
- [5] LIC. LOURDES MARÍA VEGA SOMONTE, DRA. DAISY FERRER MARRERO, (2005). “*Alternativas para la tinción y diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide*” Instituto de Medicina Legal. Ciudad de la Habana. CUBA. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Octubre, 12 p.
- [6] GABRIEL MAYORAL ANDRADE Y COLS. (2006). “*Identificación forense de fluido seminal*”. Laborat-acta 18:43-6. Volumen 18, número 2, 46 p.
- [7] EBELING, W., ET AL. (1974) *Proteinase K from Tritirachium album limber*. Eur. J. Biochem.
- [8] www.wikipedia.org/wiki/Proteinase_K.
- [9] VICTORIA PRIETO RUIZ CANELA, “*Estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de biología*”. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses Departamento de Sevilla.

- CAPÍTULO 8: REFERENCIAS
- [10] RAIMUNDO GARCÍA DEL MORAL. *Manual de Laboratorio Clínico Diagnóstico Anatomía Patológica*. Mc Graw Hill Interamericana. Colombia.
 - [11] DR. EDUARDO PÉREZ CAMPOS. *Centro de investigación en Ciencias Médicas y Biológicas, Facultad de Medicina*. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, México.
 - [12] JOSÉ LUQUE CABRERA, MIGUEL ÁNGEL HERRÁEZ, ÁNGEL HERRÁEZ SÁNCHEZ, (2001). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier, España.
 - [13] RAFAEL ALCARAZ MANZANO MÉDICO FORENSE. (2007). *Criminalística y escena de la muerte*. Publicado el 2 de junio, 2007, www.experticia.net, laboratorio de inteligencia e ingeniería documental.
 - [14] GLENN D. ISRAEL. (1992). *Determining Sample Size*. University of Florida, IFAS Extension. 5p.

CAPÍTULO 9: ANEXOS.

A.- CARACTERES DEL ESPERMA.

El semen es una mezcla viscosa de células, aminoácidos, azúcares, sales, iones y otros componentes orgánicos e inorgánicos. Éste es un líquido filante, cremoso, de color opalino, que tiende a amarillo verdoso cuando pasa el tiempo.

Está formado por: *espermatozoides* (5-7% del volumen total, con 1,3 pg DNA por célula) formados en los tubos seminíferos del testículo, y *plasma seminal*, una fracción líquida de secreciones de las vesículas seminales (50% en volumen), la próstata (20% en volumen), las glándulas bulboorrectales y el epidídimo. [12]

La eyaculación normal es de 2 a 4 ml, conteniendo unos 100 millones de células por mililitro.

a) Espermatozoide:

El espermatozoide es la célula sexual masculina originada por la espermatogénesis, que se produce en los túbulos seminíferos del testículo durante la vida sexual activa, como consecuencia de la estimulación de dicho órgano por las hormonas gonadotrópicas de la porción anterior de la glándula hipófisis. [5]

Es el principal componente celular del semen, es una célula especializada, flagelada, que mide entre 50 y 55 μm , y se distinguen básicamente dos partes: cabeza y cola. La cabeza tiene forma oval y aplanada, con unas dimensiones de 4,5 μm de largo por 2,5 μm de ancho por 1,5 μm de grosor, ésta se corresponde con el núcleo y cuello continuándose con el segmento terminal. La cabeza cuenta con el material genético y el acrosoma formado por el aparato de Golgi, que contiene hialuronidasa y proteasa, enzimas que juegan un importante rol en la fertilización.

Algunas enfermedades, condiciones genéticas, el abuso de alcohol y drogas, la exposición a determinados agentes químicos y acciones quirúrgicas pueden reducir drásticamente el número de espermatozoides en el eyaculado (oligozoospermia) e incluso provocar su ausencia (azoospermia). [9]

b) Plasma seminal:

Presenta las siguientes características:

1) Bioquímicas:

- Glúcidos: fructosa, ribosa, inositol y sorbitol.
- Compuestos nitrogenados: gran concentración de aminoácidos libres, aminas (espermina, colina y etanolamina), ergotioneína.

2) Antigénicos:

- Albúmina, dos o tres alfa-globulinas (una de ellas es una fosfatasa ácida y otra es una glucoproteína), dos beta-globulinas (una de ellas siderofilina) y un gamma-globulina.

3) Enzimáticas:

- Fibrinolisisina, aminoxidasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, 5-nucleotidasa.

4) Lípidos:

- Lecitinas y ácidos grasos (prostaglandinas).

5) Minerales:

- Zinc y calcio.

Cuando el hombre eyacula, los espermatozoides sobrevivirán dependiendo de la región del cuerpo donde se depositan; la posibilidad de encontrarlos depende fundamentalmente de que se haya o no realizado limpieza. La duración aproximada en el canal endocervical es de 114 horas, en fondo de saco vaginal 120 horas, rectal 65 horas, anal 46 horas y en la boca 6 horas. En el caso de niños, si no se recolecta la evidencia antes de las 24 horas es mejor no recolectarla. [11]

Las muestras obtenidas de las manchas o trazas de evidencia se emplearán para examen microscópico, con propósito de visualizar espermatozoides, identificar fosfatasa ácida como prueba presuntiva de presencia de semen. Las muestras extraídas de la escena

del crimen sirven para efectuar análisis del DNA de los sospechosos, mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Las muestras frescas se deben analizar antes de una hora de su recogida, manteniéndolas a temperatura corporal durante su transporte. Los espermatozoides se pueden separar del resto de las células (epiteliales, sangre, etc.) mediante lisis diferencial de éstas con SDS (dodecilsulfato sódico) y proteinasa k. [12]

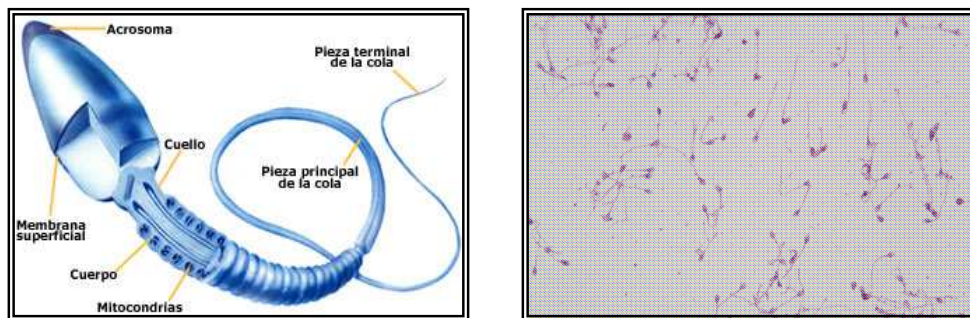


FIGURA A.1 izquierda, esquema de la estructura de un espermatozoide; derecha, frotis de espermatozoides teñidos con Hematoxilina-Eosina.

B.- PROTEINASA K.

Es una proteasa endolítica. Aislado de la flora saprofita hongo *Tritirachium álbum*, descubierta en 1974. Presenta una alta actividad que es estable en una amplia gama de Ph (pH 4-12, con un pH óptimo de pH 7.5-12) y condiciones de temperatura. La actividad de la proteinasa k aumenta con temperaturas elevadas de hasta 65°C. [7]

Ésta se utiliza comúnmente en la biología molecular para digerir las proteínas y eliminar la contaminación de los preparativos de ácidos nucleicos. Además inactiva rápidamente nucleasas que de otro modo podrían degradar el ADN o ARN durante la purificación. Es muy adecuado para esta aplicación, ya que la enzima se activa por la presencia de sustancias químicas que desnaturalizan las proteínas, como el SDS y la urea,

agentes quelantes como el EDTA, reactivos sulfhidrilos, así como la tripsina o quimotripsina inhibidores. [8]

El tampón de digestión, esta constituido por la proteinasa K, así llamada por su actividad hidrolizante de keratinas, y SDS (dodecilsulfato sódico), un detergente que desnaturaliza las proteínas dejando las cadenas polipeptídicas accesibles a la proteinasa K. Las proteínas de la cabeza del espermatozoide son especialmente ricas en aminoácidos azufrados, los cuales forman puentes disulfuro que las hacen resistentes a la acción de la proteinasa K. En presencia de un agente reductor fuerte, normalmente el ditioneitol (DTT) estos puentes se desorganizan permitiendo actuar a la proteinasa. [9] Aprovechando esta particularidad de los espermatozoides, su resistencia a la digestión con proteinasa K, es posible separar una fracción enriquecida en ADN de espermatozoides del ADN de otras células presentes en la muestra. Este tipo particular de extracción se conoce como lisis diferencial.

B.1 PROTOCOLO DE DIGESTIÓN CON PROTEINASA K:

- 1) A 130 microlitros de Buffer PBS se le agregan 2 microlitros de proteinasa K, posteriormente a esta solución, contenida en un tubo eppendorf, se le agrega la muestra y se deja a 37°C durante 2 horas.
- 2) Centrifugación por 10 min. A 1000 rpm para la obtención de pellets.
- 3) Se elimina el líquido sobrenadante dejando el pellet precipitado, a éste se le agregan 2 gotas de suero fisiológico y se extiende sobre un portaobjetos.
- 4) Se procede al secado de las muestras, para ello se colocan los portaobjetos con la muestra sobre la platina caliente a 60°C.
- 5) Posteriormente se realiza la tinción Gram.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

C. - DISEÑO DE PORTAOBJETOS.

Se diseñaron portaobjetos para concentrar la muestra en un espacio y área adecuada, con objeto de medir el número de campos visuales en la muestra bajo microscopio óptico y así poder programar de forma exacta los movimientos que deberá realizar el Robot. Para ello, se utilizaron portaobjetos esmerilados de 26 x 76mm sobre los cuales se modificaron distintos moldes de manera que permitieran crear separaciones con relieves, como pequeñas celdas en donde se pudiera mantener la muestra de manera homogénea en la placa, con tal propósito se utilizó pintura spray color negro, la cual además de permitir lo antes planteado, logro mantenerse a través de los procesos posteriores (Tinción en placa) y no interactuar con la muestra en sí.

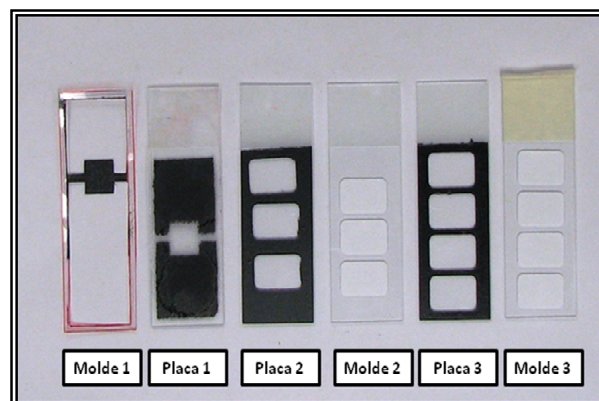


FIGURA C.1 pruebas de diseño

El molde 1 se confecciono de mica, no logrando el objetivo esperado, debido a que no quedaba bien delimitada escurriendo la muestra, además solo se podía obtener una sola celda por portaobjeto.

En el molde 2 se utilizaron 3 etiquetas autoadhesivas de 11x17 mm, las cuales se adherían de tal forma que al pintarlas con el spray se formaba la separación con los relieves adecuados, lo que permitía que la muestra no escurriera. Sin embargo no eran

reproducibles al no contar con parámetros que permitieran la ubicación exacta de los adhesivos.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

En el molde 3 se utilizaron 4 etiquetas autoadhesivas, las cuales se adherían de tal forma que al pintarlas con el spray negro se formaba la separación con los relieves adecuados, lo que permitía que la muestra no escurriera. Para el posicionamiento de las etiquetas se utilizó un molde en papel milimétrico solucionando el problema de reproducibilidad de la posición de éstas. Sin embargo, el número de separaciones no se podía observar bajo microscopio, debido a que la última celda era tapada con el soporte que sostiene la placa en el microscopio.

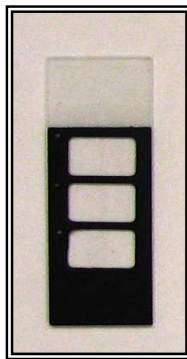


FIGURA C.2 Placa final utilizada para estudio.

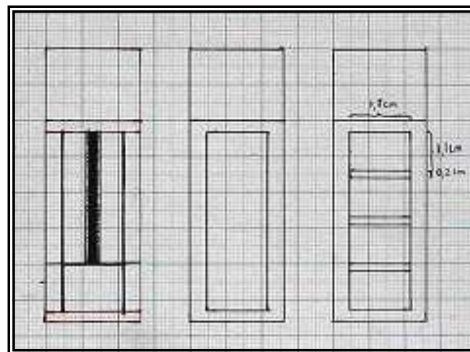


FIGURA C.3 Molde utilizado para alinear etiquetas adhesivas.

En La figura C.2 se observa la placa final que se utilizará en el estudio. Esta se obtuvo rescatando las características de los moldes 2 y 3 mencionados con anterioridad. En este diseño de placa se logran colocar tres muestras distintas, gracias a la individualización por celdas.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

D.- PRUEBAS DE CERTEZA.

Para la prueba de certeza en la búsqueda de espermatozoides y sus derivados, se han propuesto muchas variantes, aunque las diferencias entre las distintas técnicas recaen tan sólo en el procedimiento de extracción o aislamiento del espermatozoide:

- 1) Maceración simple, seguida de expresión, centrifugación o raspado con un escalpelo del tejido macerado y depósito de los productos así obtenidos en un porta.
- 2) Destrucción del soporte con ácido sulfúrico al 80%, que destruye los tejidos y no los espermios.
- 3) Tinción de los espermatozoides sin separación del tejido: la mancha macerada se disocia con dos agujas finas y los hilos se tiñen con los colorantes habituales o con técnicas de impregnación argénticas.
- 4) En los últimos tiempos se han propuesto el empleo de técnicas ultrasónicas para separar los espermatozoides de la matriz o el soporte.
- 5) Otra técnica es la aplicada en la citología de filtración sobre millipore y tinción. [1]

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

E.- TINCIÓN GRAM.

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico. Su utilidad práctica es indiscutible y en el trabajo microscópico de rutina del Laboratorio de Microbiología, las referencias a la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos, negativos, etc.) se basan justamente en la tinción de Gram.

Esta tinción se denomina así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, Gram-positivas y Gram-negativas.

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula Gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano (80%-90%), así como a un porcentaje de ácido teicoico. La pared de la célula Gram-negativas, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. En la técnica de Gram, las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta, colorante básico el cual se unirá a los grupos ácidos de la célula (ácido desoxirribonucleico), y son lavadas luego con agua corriente para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las Gram-positivas como las Gram-negativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre posteriormente con una solución de yodo-yoduro potásico (Lugol), éste permitirá formar una unión covalente entre colorante y célula.. El ingrediente activo es aquí el I_2 ; el KI simplemente hace soluble el I_2 en agua. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo

tanto las células Gram-positivas como las Gram-negativas se encuentran en la misma situación.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I_2 -cristal violeta. Algunos organismos (Gram-positivos) no se decoloran, mientras que otros (Gram-negativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gram-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células Gram-positivas son todavía azules, pero las Gram-negativas son incoloras.

Para poner de manifiesto las células Gram-negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina ácidas. Lo que permitirá la coloración de componentes básicos de la muestra. Después de la coloración de contraste las células Gram-negativas son rojas, mientras que las Gram-positivas permanecen azules. [10]

Debido a la capacidad de tinción de la técnica de Gram, de colorear sustancias con características aniónicas y catiónicas, se ha utilizado como técnica de referencia para la tinción de frotis con espermatozoides. Esto es debido a la estructura molecular de su membrana, la que como se menciono anteriormente, esta compuesta principalmente por glicoproteínas que permiten la interacción molecular con los distintos colorantes de la técnica especificada.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

E.1 TÉCNICA DE GRAM:

E.1.1 Solución de Cristal Violeta

Se prepara de la mezcla de 2 soluciones:

- *Oxalato de amonio al 1% y Cristal Violeta al 1%:*

Se pesan en balanza analítica 2 gramos de oxalato de amonio p.a. en vaso precipitado de 250 ml. Disolver con 200 ml. De agua destilada. Esta solución se mezcla con 100 ml. De cristal Violeta preparada al 1%. Se agitan los 300 ml. De solución.

- *Solución de Lugol:*

La solución a utilizar se prepara a partir de una solución concentrada de lugol en una proporción de 1:15. Tomar 20 ml. De la solución madre y colocar en un vaso de 500 ml. Agregar 300 ml. De agua destilada. Agitar vigorosamente.

- *Solución madre para lugol:*

Se pesan 5 gramos de cristales de yodo y se disuelven con agua destilada en matraz aforado de 100 ml. Se pesan además 10 gramos de ioduro de potasio, los que se incorporan en el matraz. Aforar a volumen de 100 ml.

- *Solución saturada de fucsina:*

Pesar 12 gramos de fucsina en vaso precipitado de 100 ml. Traspasar a matraz de aforo de 1 litro y completar a volumen con alcohol etílico.

- *Solución de fenol al 5%:*

Pesar 5 gramos de fenol p.a. en vaso precipitado, disolver con agua destilada, completar a volumen de 10 ml. Con agua destilada.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

Solución de fucsina fenicada:

Se prepara a partir de una solución saturada de fucsina. Tomar 10 ml. De la solución saturada. Agregar 90 ml. De una solución de fenol al 5% en agua destilada. Agitar.

E.1.2 Reactivo para la fijación de placa:

Solución fijadora de placa: Alcohol: éter 1:1.

Medir 250 ml. De alcohol al 95% en vaso precipitado y transferir a un vaso de 1 litro de color ámbar. Agregar 250 ml. De éter medidos en vaso precipitado. Agitar y envasar en frasco ámbar.

E.2 PROTOCOLO DE TINCIÓN GRAM:

- 1) Fijación de las muestras. Se utiliza alcohol-éter, debido a que en la envoltura de las células hay lípidos, que son arrastrados y eliminados por este fijador. Se coloca en la platina caliente hasta que la solución se seque.
- 2) Se colorea luego con Cristal violeta por 1 minuto (este colorante básico teñirá estructuras ácidas en la muestra, como DNA)
- 3) Lavado de muestra con agua corriente.
- 4) Se agrega luego lugol, se deja actuar por 1 minuto sobre la muestra. El lugol actúa como mordiente.

- 5) Lavado con agua corriente.
- 6) Se le agrega acetona, la que se deja actuar por unos segundos. Esta elimina el colorante que no se unió a las estructuras de la muestra.
- 7) Sin enjuagar se elimina la acetona que puede haber quedado en la muestra, sacudiendo la lámina suavemente. Se aplica la fucsina ácida por 1 minuto. Este colorante se unirá a las estructuras básicas de la muestra.
- 8) Enjuagar con agua corriente.
- 9) Enjuagar con agua destilada. Ésta evitará que las sales del agua corriente interfieran en la observación microscópica y en la misma muestra.

Nota: Todo el procedimiento de la técnica de GRAM, se realiza directamente sobre la placa y no en coplin, debido a que los reactivos se contaminan y pueden darse falsos positivos. [4]



FIGURA E.1 Espermatozoide con tinción Gram.

CAPÍTULO 9 : ANEXOS

F.- ROBOT.**F.1 MOTORES PASO A PASO:**

Este tipo de motores tiene como característica su gran precisión de giro, lo que le permite no sólo poder controlar la cantidad de vueltas del mismo, sino que hasta centésimas de las mismas. Además da solución a problemas que poseen otros tipos de motores como lo es la inercia mecánica y la dificultad para controlar la velocidad.

Características del motor Paso a Paso:

Interior: Compuesto por dos bobinas con punto medio. Estas bobinas se ubican en lo que se denomina *estator*, es decir la carcasa exterior del motor. La parte móvil de este motor al igual que en los de corriente continua es estriada y se denominada *rotor*.

Exterior: Posee 6 o 5 cables. Cuatro de estos cables corresponden a cada uno de los extremos de las dos bobinas existentes, mientras que los otros dos corresponden al punto medio de cada una. En el caso de que el cable restante sea uno corresponde a estos dos últimos unidos internamente.

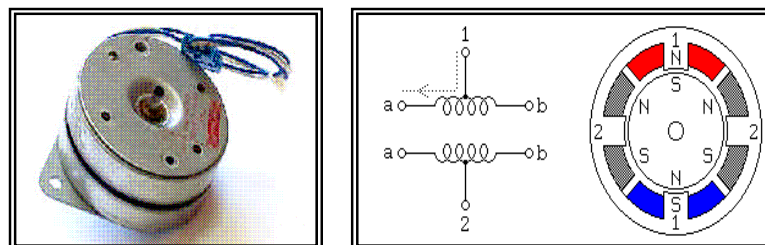


FIGURA F.1 izquierda: exterior del motor; Derecha: interior del motor

El motor Paso a Paso es un elemento capaz de transformar pulsos eléctricos en movimientos mecánicos. El eje del motor gira un determinado ángulo por cada impulso de entrada, con lo que el movimiento es muy preciso y fiable. Puede girar en los dos sentidos, y el ángulo de giro puede variar entre $0,72^\circ$ (500 pasos / 1 vuelta) y 90° (4 pasos / 1 vuelta).

La característica principal de estos motores es el hecho de poder moverlos un paso a la vez por cada pulso que se le aplique. Este paso puede variar desde 90° hasta pequeños movimientos de tan solo 1.8° , es decir, que se necesitarán 4 pasos en el primer caso (90°) y 200 para el segundo caso (1.8°), para completar un giro completo de 360° .

F.2 DESCRIPCIÓN DEL ROBOT:

El Robot esta constituido por:

- Un microscopio Olympus CX31 con adaptador para cámara fotográfica.
- Cámara Fotográfica Canon EOS Digital Rebel XTi 4.5.1.
- Circuito o relay Board.
- Arduino USB Board decimila Sku: MCI-TDD-OD273, más software de programación.
- Disparador remoto cámara Fotográfica.
- Cargador Cámara Fotográfica.
- 3 motores paso a paso Sku: MCI-RBT-00320.
- Easy Driver V3, stepper motordriver Sku: MCI-RBT-00328
- Conector JST 6 piner Sku: MCI-RBT- 00328
- Notebook Compac Presario.
- 2 cables para puerto USB (cámara y Notebook).

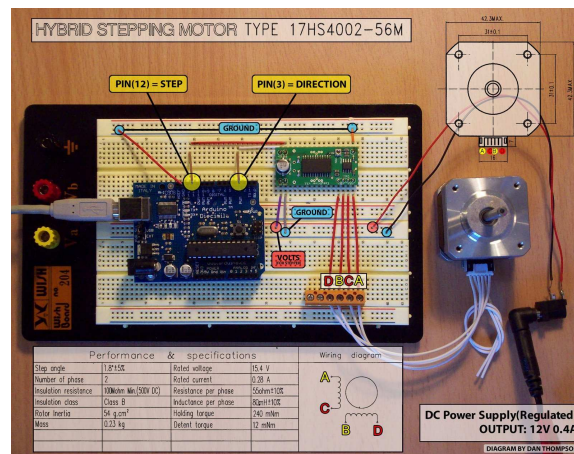


FIGURA F.2: Microprocesador.

El microprocesador, Arduino USB Board Decimilla, permitirá conducir o comandar los movimientos especificados del microscopio y el disparador remoto de la cámara, mediante el uso de un software, Arduino Pro 3.0, al cual se le programarán los movimientos en el plano X e Y, tiempos de duración y el disparador automático de la cámara.

```

Arduino - 0003 Alpha
File Edit Sketch Tools Help

led_blink

/* Blinking LED
 *
 * turns on and off a light emitting diode(LED) connected to a digital
 * pin, in intervals of 2 seconds. Ideally we use pin 13 on the Arduino
 * board because it has a resistor attached to it, needing only an
 *
 * Created 1 June 2005
 * copyright 2005 DojoDave <http://www.0j0.org>
 * http://arduino.berlios.de
 *
 * based on an original by H. Barragan for the Wiring i/o board
 */

int ledPin = 13;          // LED connected to digital pin 13

void setup()
{
  pinMode(ledPin, OUTPUT); // sets the digital pin as output
}

void loop()
{
  digitalWrite(ledPin, HIGH); // sets the LED on
  delay(1000);                // waits for a second
  digitalWrite(ledPin, LOW);  // sets the LED off
  delay(1000);                // waits for a second
}

```

FIGURA F.3: Programador de microprocesador Arduino.

Los tres motores irán conectados al microprocesador mediante el Easy Driver el cual permite alimentar sus estatores en la secuencia correcta, además controla el paso y dirección del motor. El primer motor permitirá el movimiento en el plano X, el segundo motor permitirá los movimientos en el plano Y, y el tercer motor permitirá regular el foco de forma constante, modificando el micrométrico. El disparador fotográfico irá conectado directamente al canal del relay que comandará su función a través del microprocesador.

Una vez adaptado cada uno de los motores, se procede a especificar los movimientos y tiempos que se requieren, mediante un software, Arduino Pro 3.0. Esto se logrará mediante la comunicación vía puerto USB desde el computador donde se encuentra el programa, al microprocesador.

Para la obtención de las imágenes fotográficas, se encuentra conectada la cámara a uno de los puertos USB del notebook. Esta será activada a través del disparador remoto, obteniéndose así 3 imágenes por cada campo. Las imágenes obtenidas de cada uno de los campos, serán procesadas posteriormente con el software Helicón Focus 4.6, el cual tomará éstas 3 imágenes desde el archivo que recopila las fotografías y mediante la superposición de fotos mejorará el foco. Una vez obtenida la imagen mejorada, será enviada a una carpeta final, en donde se almacenarán todas las imágenes procesadas.

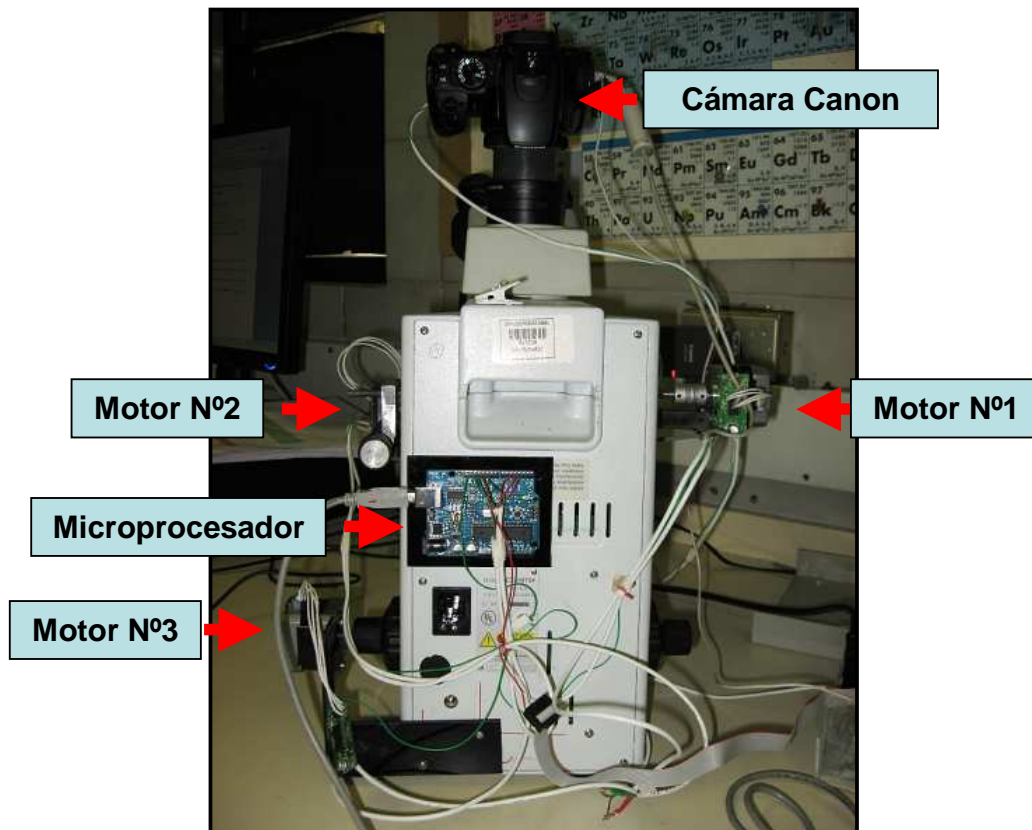


FIGURA F.4: Robot (Vista Posterior).