

Persistencia de Manchas de Semen en Hisopos Sumergidos en Agua de Mar y su Valoración para el Análisis de ADN

Iris Catherine Carma¹, Nelsy Rivero Paredes¹, Cristy León Valenzuela², Belinda Márquez Álvarez¹.

¹ Servicio Nacional de Medicina y Ciencias Forenses (SENAMECF).

² INSIDEGEN C.A.

¹ e-mail: senamecfgeneticaforense@gmail.com

Palabras claves: semen, espermatozoides, antígeno prostático, ADN.

Introducción

Las manchas de semen son cruciales en la comprobación de agresiones sexuales (AS), pero, su detección disminuye en el tiempo si se encuentran sobre soportes sumergidos en agua. En Venezuela, el protocolo de investigación de AS incluye realizar un hisopado vagino-rectal a la víctima, para determinar la presencia de espermatozoides y de antígeno prostático específico (PSA), así como obtener el perfil genético. Beckwith *et al.* (2020), encontraron que el algodón retiene espermatozoides más tiempo que otros materiales, permitiendo obtener perfiles de ADN más completos. Un ensayo con hisopos de algodón impregnados de semen y sumergidos en agua de mar busca determinar el tiempo máximo de detección de estos indicadores.

Investigación

Área de estudio

En Caraballeda, La Guaira, Venezuela, fue recolectada agua de mar a 5 metros de profundidad. Coordenadas: latitud 10° 39' 27,6" N y longitud 66° 51' 35" W (Figura 1).

Latitud 10° 39' 27,6" N,
Longitud 66° 51' 35" W

Figura 1. Georreferenciación del lugar donde se recolectó el agua de mar.

Metodología

- Con un refractómetro y una sonda fueron medidos *in situ* las variables: oxígeno disuelto, temperatura, pH, salinidad y conductividad eléctrica del agua de mar (Tabla I) (Figura 2A).
- Se obtuvo semen de un donante con su respectivo consentimiento informado, el cual fue evaluado según las pautas de la OMS (2010), para examinar y procesar semen humano.

Tabla I. Parámetros físico-químicos obtenidos *in situ* del agua de mar.

Parámetro	Valores
Oxígeno disuelto (mg/ml)	6,40
Temperatura (°C)	26,4
pH	7,9
Salinidad (g/l)	36,5
CE (µS/cm)	46.500

- El semen fue impregnado en 26 hisopos de algodón estéril, e incubados por 12 horas a 25°C (Figura 2B).

Tabla II. Detección de espermatozoides, PSA y cuantificación de ADN.

Ensayos (τ horas)	12	24	36	72	120	144
Tinción Ziehl Neelsen	-	-	-	-	-	-
Inmunoensayo-PSA	+	+	+	+	+	+
ADN ng/µl -Extracción por perlas magnéticas	19,5	14,5	14,7	13,7	11,9	13,3

- Los hisopos fueron colocados en tubos eppendorf con 0,5 ml de agua ultra pura o *milliQ* y se agitaron con vórtex para generar un sedimento celular.

- Se realizó un extendido y se tiñó, según el método de Sánchez & Sánchez, 2021 (Tabla II).

- En el sedimento se detectó PSA mediante test de inmunoensayo (ADVIN Biotech®) (Tabla II).

- Cada 12 horas se realizó la extracción y cuantificación de ADN de hisopos obtenidos en el paso 3, se empleó el protocolo (MaikoBead 32®) sistema con perlas magnéticas automatizado (Figura 2E).

- La cantidad y calidad del ADN obtenido se ponderó en forma cuantitativa, utilizando un espectrofotómetro UV/visible (NanoDrop™ 2000®) (Figura 2F).

Figura 2 pasos del procedimiento experimental, para ver más detalles escanear el código QR.



Discusiones

Tinción Ziehl Neelsen	Este método resultó poco sensible, se reporta ausencia de espermatozoides, aun cuando la muestra de semen inicial presentaba una concentración mayor a 20 millones/ml. Es probable que la pérdida de sensibilidad del método se deba a la dilución de la muestra (paso 4 y 4.1). Beckwith <i>et al.</i> (2020), observaron espermatozoides empleando la tinción "Árbol de Navidad" en muestras de semen sobre tela de algodón sumergidas en agua de mar por 5 minutos, luego de 12 horas no encontraron espermatozoides.
Inmunoensayo-PSA	La detección de PSA fue posible hasta las 144 h de evaluación.
ADN ng/µl -perlas magnéticas	La concentración de ADN osciló entre 11,9 y 19,5 ng/µl. La relación de absorbancia $A_{260/280}$ estuvo por encima de 1,5 a partir de la segunda medición, condición favorable para un proceso de secuenciación de ADN. En general, un aumento en el tiempo de inmersión reduce la detectabilidad de semen en hisopos sumergidos en agua de mar, para aumentar la probabilidad de obtener un perfil completo se podrían usar kits miniSTR (Borde <i>et al.</i> 2008).

Conclusiones

A partir de la presente investigación, en el laboratorio de Biología Forense del SENAMECF, se comprobó la idoneidad de la experticia hasta las 144 horas, para el estudio de manchas de semen impregnadas en hisopos sumergidos en agua de mar. No obstante, se recomienda apoyar este análisis con la valoración de la integridad del ADN en gel de agarosa, su amplificación por PCR y posterior secuenciación.

Bibliografía

