



**BENEMERITA UNIVERSIDAD
AUTONOMA DE PUEBLA**



**Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Análisis Clínicos**

LICENCIATURA QFB

**IDENTIFICACIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA, P30 Y
ESPERMATOZOIDES, RECABADAS EN HISOPOS A
DISTINTAS DILUCIONES Y TIEMPOS DE
ALMACENAMIENTO**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FÁRMACOBIOLOGO**

PRESENTA

p Q. F. B. OSWALDO ZAGAL RAMOS

**DIRECTOR:
ING. BIOQUIMICO ROBERTO QUINTANA VEGA**

**ASESOR:
M. C. RAFAEL MUÑOZ BEDOLLA**

Septiembre 2016

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas y a los maestros que imparten en ella, por la formación y preparación recibida.

A la Fiscalía General del Estado de Puebla por el apoyo durante mi estancia en el servicio social y práctica profesional, por ser la primera institución ajena a la universidad en creer y confiar en mí, no sólo para la realización de este proyecto sino de muchos otros. Por su paciencia y comprensión en momentos difíciles. En especial a la M.C Flor Bertoni Ruiz, al Ing. Bioquímico Roberto Quintana Vega y a la D.C Eulalia Dolores Bautista España.

A mis padres por darme aliento en los momentos buenos y malos de la carrera, por su arduo esfuerzo realizado para que yo pudiera estudiar, y por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida y en esta nueva etapa que comienza como profesionista.

A mis amigos y ahora colegas por hacer de mi estancia en la universidad un poco más tranquila y llevadera.

Al Doctor Victorino por ser una de las personas en impulsar mi capacidad y mejora académica, por su paciencia y apoyo incondicional, por brindarme siempre un poco de su tiempo para atenderme y ayudarme.

Al Químico José Ángel por su exigencia y consejos a lo largo de los cursos que me impartió, que a día hoy me son de gran utilidad.

A la Química Martha por su atención y asesoría prestada en cada duda que llegue a tener a lo largo de mi preparación.

Por último quiero agradecer a una persona muy especial para mí, que no sólo ha estado a lo largo de este proyecto, sino también me ha apoyado en otros proyectos y situaciones de mi vida, gracias a ti mi novia Karina Galindo Ramos, sin ti no sé si habría podido concluir estos proyectos.

Índice

Resumen	1
Introducción	2-13
Planteamiento del problema	14
Justificación	15
Hipótesis nula	16
Hipótesis alterna	16
Objetivos	
General	17
Específicos	17
Metodología	18
Tipo de muestra	18
Muestras a observar	18
Tipo de población	18
Esquema de trabajo	19
Materiales	20-21
Método 1	21-22
Método 2	22-23
Método 3	24
Resultados	25-32
Discusión de resultados	33-35
Recomendaciones y conclusiones.....	36
Bibliografía	37-39
Anexos	40-43

Resumen

La violación es un evento que siempre causa un estrés postraumático a la persona agredida. El delito de violación es uno de los más cometidos durante el año. En 2010, México ocupó el primer lugar a nivel mundial. En el 2013, en la ciudad de Puebla se reportaron 824 violaciones a lo largo del año y la incidencia de este delito aumenta 5% cada año.

En la Fiscalía General del Estado de Puebla dentro del laboratorio de Genética Forense se realizan tres pruebas: Fosfatasa ácida, p30 e identificación espermática, utilizando la tinción de Christmas tree, a las muestras relacionadas con estos delitos, el problema es que dichas muestras no llegan el mismo día que son recabadas.

En este proyecto se analizó cada una de las pruebas, observando su sensibilidad y especificidad, y a la vez se buscó saber hasta qué momento las pruebas continúan arrojando resultados positivos.

Los resultados obtenidos a lo largo del proyecto ayudaron a conocer que prueba es la más confiable, y mostraron que dentro de los primeros 5 días, se le puede realizar cualquiera de las 3 pruebas a una muestra, pero si trascurren más días, se recomienda descartar la prueba de fosfatasa acida.

La prueba más concreta es la proteína p30, ya que esta siempre fue detectable durante todo el experimento, es una proteína muy importante para el área forense y aún más en el caso de delitos sexuales, por su especificidad y difícil degradación, además de que el método utilizado para su identificación es de los más sensibles.

El proyecto también nos da un gran aporte a la ciencia, ya que con él, hoy conocemos el tiempo en el que las proteínas y espermatozoides, siguen siendo detectables en condiciones in situ, lo cual ayudara a agilizar los análisis para nuevas muestras que lleguen al laboratorio y se podrá decidir inmediatamente que prueba realizar, sin que se gasten reactivos de más.

Introducción

En México los casos de violación ocupan un lugar muy importante, como dato informativo no muy agradable ya que en 2010 fue declarado nuestro país con más violaciones a nivel mundial en base a estadística de la ONU, en el cual se reportó que un 44% de la población femenil ha sufrido violencia o atraco sexual.

La secretaría de salud reporta aproximadamente 120 mil violaciones anuales, es decir, cada 4 minutos una mujer es violada, aunque a la fecha no existe una atención integral a las víctimas porque no se da seguimiento efectivo a los casos ya que puede ser por no ser reportado ante las autoridades competentes. Esto ocasiona que sólo uno de cada diez casos de violencia sexual contra mujeres en América Latina sea castigado por la justicia, según cifras de la Oficina Regional del Fondo de Población de las Naciones Unidas. A escala nacional existe una alta cifra negra de victimización delictiva, del 85 por ciento, pues sólo 15 por ciento de los delitos son registrados por las autoridades y de éstos exclusivamente un 5 por ciento se pone a disposición de un juez como se reporta (Hernández L. 2011).

El diccionario jurídico conceptualiza a la Violación como: "Cópula efectuada mediante violencia física o moral con una persona de uno u otro sexo" (Fernández Cruz J. 2013).

Una violación equiparada se define como: Introducción por vía anal o vaginal con cualquier objeto o parte del cuerpo humano distinto al miembro viril, mediante la violencia física o moral, no importa cuál sea el sexo de la víctima. (Código Penal Federal, 2016).

El estudio de los fluidos seminales en la escena del crimen se encuentra directamente ligado a los crímenes de índole sexual y serán de vital importancia al momento de realizar la reconstrucción del hecho y el establecimiento de identidad del agresor o agresores establecido.

El semen se define de la siguiente manera: Sustancia de aspecto lechoso, opalescente, ligeramente amarillo, en el cual intervienen los órganos reproductores

masculinos. Tiene un pH de 7.2-7.3 y está compuesto por el plasma seminal y los espermatozoides que pueden ser separados por centrifugación.

El semen puede secarse al pasar el tiempo, posee un olor alcalino característico, y contiene millones de espermatozoides. Al secarse, la mancha pierde su olor, los espermatozoides mueren, adquiere un color blanco grisáceo, y a veces amarillento, esto provoca que en las telas produzca un efecto almidonado.

Sus componentes no proteicos son: NaCl, CO₂, difosfato de espermita, fósforo inorgánico, fósforo ácido soluble, fósforo de espermina, espermidina, calcio, glucosa, urea, ácido láctico, colesterol y fructosa.

Componentes proteicos: globulinas, albúminas, nucleoproteína, proteasas no coagulables, amilasa, tromboquinasa, coagulasa, licuasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, fibrinolisisina, fibrinogenasa y colina.

Dado que los estudios de semen se realizan principalmente en base a la presencia de espermatozoides, es de cabal importancia el proteger las prendas que contengan a los mismos. Muchos expertos consideran que la presencia de un espermatozoide es la única prueba irrefutable de la presencia de semen. Por esta razón, los artículos o pruebas que se sospechen como muestra deberán manejarse con mucho cuidado ya que se puede considerar como parte de la investigación y reconstrucción de los hechos por este delito, en el cual no deberá doblarse ni enrollarse la parte manchada y definitivamente no deberá someterse a fricción (Granja, J. & Macchi, J. 2001).

Es muy importante tomar en cuenta que con base a la edad del hombre la calidad espermática se va perdiendo, el principal factor es la motilidad, la cual baja un 0.8% anualmente, de otra manera esto nos indica que una persona de 22 años tiene aproximadamente el 25% de espermias con movilidad anormal, en una persona de 30 años el porcentaje es de 40% y en una de 40 y 60 el porcentaje es de 60% y 85% respectivamente. Para el número de espermias se ha visto que la pérdida por intervalos de edad es de aproximadamente 17 millones como lo describe (Sloter E. 2006).

En indicios en los que se sospecha contienen semen, se realizan pruebas de rutina las cuales buscan identificar las proteínas:

Fosfatasa ácida

La fosfatasa ácida comprende un conjunto de enzimas ampliamente repartidas en el organismo (eritrocitos, suero, plaquetas, leucocitos, bazo, hígado, osteoclastos y en epitelios glandulares de próstata, mama, estómago y colon) que pertenecen a las fosfatasas, un tipo de enzima usado para liberar grupos fosfato adheridos a otras moléculas. Se almacena en los lisosomas y funciona cuando éstos se unen a los endosomas, los cuales tienen un pH ácido. De ahí que su actividad sea óptima en pH ácidos. (Muniyan S. 2013).

Es una enzima fosfomonoesterasa no específica, se encuentra en niveles altos en el semen, proviene de las células epiteliales de la glándula prostática. El nivel de la actividad de la fosfatasa ácida es 500 a 1000 veces más alta en el semen humano que en otros fluidos o secreciones corporales. Se ha demostrado que niveles elevados de la actividad de fosfatasa ácida persiste en el tracto vaginal después de la agresión sexual. La detección de la fuerte actividad de la fosfatasa ácida es considerada como un rápido y confiable indicador de la presencia de semen. El tiempo aproximado para la detección exitosa de la fosfatasa ácida es de 48 horas después del contacto sexual. (Quispe S. 2010).

Su empleo para la identificación de semen en investigaciones forenses fue introducido por Lundquist en 1945 y con el tiempo su técnica ha sufrido una serie de variaciones. (Cerdas, López y Espinoza, 2005).

Las funciones de esta enzima son de gran importancia para que se lleve a cabo la fecundación, por ejemplo participa en la modificación de la membrana espermática para permitir su fusión con el ovocito y en la reacción acrosomal, la cual consiste en la producción de enzimas necesarias para digerir la membrana del espermatozoide y la del oocito (Cerdas Ávila, 2010). La misma autora afirma que existen diversos métodos para la detección de la fosfatasa ácida, estos se han

dividido en tres clases: la detección inmunológica, la electroforesis y la actividad enzimática, esta última ha sido la más utilizada.

Su aplicación puede darse en indicios como prendas de vestir o sábanas, así como en los aplicadores empleados por el médico legista para el levantamiento de muestras del cuerpo de la víctima.

Cuando se analicen prendas de vestir o muestras en telas, la pericia no debe realizarse directamente sobre la prenda que contiene el fluido debido al riesgo de contaminación de la muestra con los reactivos utilizados, ya que estos pueden interferir con análisis posteriores. Atendiendo a lo anterior una pequeña porción de la mancha debe ser cortada, y trasladada a un aplicador de algodón estéril o transferida a un papel filtro para la realización de la pericia. (Mozayani y Noziglia, 2006).

Esta es una precaución de gran importancia dentro del proceso penal, pues si acontece la necesidad de realizar una segunda pericia sobre el mismo fluido a causa de algún cuestionamiento o por la forma en que el dictamen fue introducido al proceso, se tiene una parte de la muestra lista para tales efectos, ya que parte del procedimiento para la correcta realización de la pericia incluye la preservación de una porción de todo fluido biológico.

Otros falsos positivos en el resultado del peritaje oficial en el caso de violación pueden ser consecuencia del tipo de material sobre el que se encuentre el fluido cuestionado, el tiempo transcurrido desde el depósito hasta su análisis, potenciales transferencias o factores propios ocurridos durante la cadena de custodia, por ejemplo, en la cavidad vaginal a las 24 horas del eyaculado la concentración de la enzima tiende a disminuir, llegando a arrojar resultados negativos a las 48 horas, mientras que si el semen se encuentra en un indicio seco y sin lavar su concentración tiende a ser más estable (Cerdas Ávila, 2010), ya que como el fluido queda adherido al material de soporte, se facilita el análisis químico-inmunológico,

la observación microscópica de los distintos tipos celulares y la futura obtención de un ADN íntegro. (Torres et. al, 2007).

También, debe tenerse en cuenta que su concentración en la cavidad vaginal puede verse afectada por factores como la presencia de fosfatasa ácida en el fluido vaginal libre de semen y su drenaje normal, su degradación por hidrolasas, la fase del ciclo menstrual, la edad de la víctima, la presencia de infecciones y, en general, por el estado del sistema inmunológico. Se debe considerar también la posible pérdida de material producto del secado y las condiciones de preservación previo al análisis, ya que estos factores pueden afectar la cantidad de fosfatasa ácida prostática que se detecte en la muestra. (Cerdas Ávila, 2010).

Por último, se debe tomar en cuenta que como cualquier enzima, la AP es susceptible a cambios de pH, temperatura, humedad y es sensible a radiaciones UV, por lo que el empleo de otros ensayos es recomendable para descartar falsos negativos por alteración de las condiciones favorables de la actividad enzimática. (Lencioni L. 2002).

Su detección se basa en una reacción cromática de la multicitada enzima, la cual reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre de alfa naftol; este reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso. (Carreño R. 2008).

P30

Es una glicoproteína producida por células de la glándula prostática en el varón, es una serínproteasa (enzima proteolítica) que activa una proteína en la vesícula seminal. El antígeno prostático específico (PSA) es secretado al fluido seminal donde tiene una función en el clivado de proteínas de la vesícula seminal y en la licuefacción del coágulo seminal. En condiciones normales, hay presentes niveles muy bajos de PSA en la sangre; el aumento sérico indica patología prostática o trauma. (Guzmán J. 2000).

La proteína P30 fue descubierta en 1970, recibió ese nombre debido a que durante su caracterización se descubrió que su peso molecular es de 30000 Dalton (Distribuidora Zogbi).

Su función principal es digerir las “proteínas semenogelina I y II, las cuales son responsables de formar coagulo seminal, licuándolo para que los espermatozoides puedan acceder al oocito” (Cerdas Ávila, 2010) y fue introducida en las ciencias forenses para identificación del semen en 1978 por Sensabaugh ya que se encuentra en ese fluido en concentraciones bastante altas.

Durante sus primeras aplicaciones se pensó que la proteína p30 se encontraba de forma exclusiva en la glándula prostática, pero estudios posteriores demostraron su presencia en la leche materna, en la orina, en el líquido amniótico y en otros fluidos, sin embargo, la concentración de la enzima en estos casos es considerablemente menor que la hallada en el semen, ya que en éste su promedio es de unos 820000 ng/ml mientras que en otros fluidos biológicos oscila entre 0,1 y 2 ng/ml. (Chacón Méndez, 2010).

Existen diversos métodos para la detección de esta proteína, los tradicionales se basaban en electroforesis cruzada y métodos de difusión como la doble difusión de Ouchterlony (Mozayani y Noziglia, 2006), sin embargo, estas pericias requieren de más tiempo y su grado de sensibilidad es menor que otros más modernos como la inmunocromatografía para la detección de la proteína P30, por ello en nuestro país se ha optado por esta última, ya que es muy sensible y tiene niveles de especificidad bastante elevados que la revisten de gran idoneidad cuando se requiere identificar semen.

El fundamento de esta prueba se sustenta en la formación de un complejo anticuerpo – antígeno, es decir, en una reacción donde un anticuerpo se enlaza a un antígeno con el fin de facilitar que otras células del sistema inmunitario lo identifiquen y que a consecuencia de ello lo inhiban (Classe Qsl, 2009). El kit ABACard p30 Test for the Forensic Identification of Semen de Abacus Diagnostics, ha sido aceptado a nivel mundial por presentar las siguientes ventajas:

- Es fácil de usar, sus resultados se obtienen 10 minutos después de efectuada la pericia, sin embargo, es común que se logren resultados positivos incluso trascurrido sólo un minuto desde su realización (Distribuidora Comercial Zogbi, 2013).

- Es altamente sensible, basta con 4 ng/mL de fluido seminal para que la prueba detecte su presencia (Romero Montoya et. al, 2011), además su rango de efectividad en muestras secas y preservadas a temperatura ambiente es bastante amplio, existen estudios en los que la prueba detectó semen en prendas con 30 años de antigüedad. (Hochmeister, et. al., 1999).

- Incluye un control interno para verificar la efectividad de la prueba, este control consiste específicamente en la formación de una línea de color rosado en el área de prueba “C”, misma que comprueba el buen funcionamiento del kit, por lo que si esta no se colorea, la pericia debe realizarse nuevamente con materiales nuevos.

- No consume ADN para su realización ni da falsos positivos al analizar fluido seminal de especies animales, con diversos fluidos de cuerpos humanos femeninos, saliva o sudoración de cuerpos humanos masculinos, ni con frotis anales. (Hochmeister, et. al., 1999)¹⁷.

El kit ABACard P30 Test for the Forensic Identification of Semen utiliza anticuerpos monoclonales del antígeno prostático previamente enlazados con partículas teñidas, los cuales se adhieren a la proteína P30 presente en las 5 gotas del fluido a identificar (Elkis, 2013). Los anticuerpos junto al antígeno prostático o proteína P30 dan como resultado un complejo anticuerpo – antígeno.

Ese complejo migra a través de la membrana del dispositivo hasta el área de prueba y el área control, áreas en las que interactúa con un anticuerpo policlonal de manera que se forma un complejo anticuerpo – antígeno – anticuerpo que será verificable a simple vista por la aparición de una línea de color rosado tanto en el área “T” como en el área “C”, con lo cual se entiende como un resultado positivo para la presencia de la proteína P30.

Si a consecuencia de la pericia únicamente se colorea la línea del área “C”, el resultado es negativo, lo cual daría fe no solo de la ausencia de la proteína P30 sino también del buen funcionamiento de la prueba (Hochmeister, et. al., 1999) y si no aparece ninguna línea de color en el área de control “C”, la pericia debe tenerse por inválida con independencia de la presencia o ausencia de línea de color en el área de prueba “T”.

(Hochmeister et. al., 1999), señalan que cuando el resultado de la prueba sea negativo, deben observarse tres posibilidades:

- Ausencia del antígeno prostático o proteína P30.
- Presencia del antígeno pero a niveles inferiores del mínimo detectable por la pericia.
- Concentración excesiva del antígeno, esto puede suceder con muestras cuyas concentraciones sean mayores a los 50000 ng/mL, lo cual puede ser prevenido por parte del perito con el uso de porciones más pequeñas de la muestra o diluyéndola previo a la realización de la pericia.

Esta es la prueba confirmatoria por excelencia para la detección de semen ya que logra identificaciones positivas incluso en casos donde otras técnicas como la detección de fosfatasa ácida han arrojado resultados negativos (DiMaio y DiMaio, 2001), sin embargo, como resulta de esperar al tratar con fluidos biológicos, la eficacia de esta pericia depende en gran medida del factor tiempo, ya que “su concentración en la cavidad vaginal disminuye hasta dar resultados negativos 24 horas post eyaculado, siendo el tiempo aún menor para las cavidades anal u oral” (Cerdas, et. al., 2005), pero su estabilidad aumenta si el fluido se encuentra en un indicio seco y sin lavar.

Además, su concentración puede verse afectada por condiciones fisiológicas propias de la víctima, como por ejemplo su nivel de pH vaginal, la fase del ciclo menstrual en que se encuentre, su edad y el estado de salud en general (Cerdas Ávila, 2010).

Tampoco puede dejarse de lado la importancia del almacenamiento previo que haya tenido el kit a utilizar, ya que ésta debe conservarse a una temperatura menor de 28° C, si se requiere puede refrigerarse, pero bajo ninguna circunstancia debe congelarse. En caso de que el kit esté refrigerado debe permitírsele alcanzar la temperatura ambiente previo a la realización de la pericia (Distribuidora Comercial Zogbi). No está de más mencionar que este no debe utilizarse si ya se ha cumplido la fecha de caducidad que se señala en el empaque.

Se considera que para los fines del proceso penal la determinación de proteína P30 es la pericia con mayor idoneidad para la identificación de semen ya que no se restringe a la detección de espermatozoides, por lo que si la muestra carece de ellos aún es posible la identificación del fluido y consecuentemente la individualización del autor del delito.

Esta es una ventaja en aquellos casos donde el autor del delito sexual está vasectomizado, sufre de oligospermia – bajo conteo de espermatozoides – o de azoospermia, ya que en estos casos pruebas como la Tinción de Christmas Tree podrían arrojar resultados negativos aun tratándose de semen, mientras que con esta pericia se recurre al análisis del plasma seminal y no restrictivamente a la localización de espermatozoides.

Para la búsqueda de células espermáticas se utiliza la siguiente tinción:

CHRISTMAS TREE

Los dos tipos de tinción de espermatozoides más comunes son el Nuclear Fast Red y el Picroindigocarmín, los cuales son conocidos de forma conjunta como Tinción de Christmas Tree (Mozayani y Noziglia, 2006) o por su traducción al español como Tinción de Árbol de Navidad. Esta pericia fue desarrollada por Oppitz en el año 1969 y posteriormente fue mejorada por Stone en 1972, momento a partir del cual se convierte en exclusiva para la identificación de espermatozoides. (Gaensslen, 1983, Cerdas Ávila, 2010).

Cuando el fluido analizado es semen, a raíz de esta pericia los espermatozoides presentan una coloración de un rojo fuerte en su cabeza, rojo

pálido en el cuello y verde o verde azulado en el flagelo (Mozayani y Noziglia, 2006) de allí su comparación con un arbolito de navidad.

En el conteo de espermatozoides debe incluirse aquellos cuya anatomía está incompleta, por ejemplo los que se encuentren carentes de flagelo, (Cerdas Ávila 2010) comenta que esta situación es bastante común y puede deberse tanto a la violencia asociada con la agresión como por el proceso de recuperación de los espermatozoides. (Tilstone, et. al., 2006) sostienen que en el proceso de degradación natural de los espermatozoides lo primero que desaparece son los flagelos.

Inmediatamente después de la eyaculación inicia su desintegración, de forma que 6 horas después de esta 25% de los espermatozoides habrán perdido el flagelo. A las 12 horas habrá pocos espermatozoides aún con el flagelo intacto y después de 24 horas existirán únicamente unas cuantas cabezas. Los mismos autores señalan que estas condiciones son variables de acuerdo con factores como:

- Condiciones ambientales, incluyendo el nivel de humedad, temperatura atmosférica y condiciones climáticas, sin embargo, aún ante estos factores si la mancha de semen se ha secado rápidamente puede preservar semen intacto por meses e incluso años.

- El lugar en el cual se realizó el depósito, sea que la muestra se encuentre sobre el cuerpo de la víctima, en alguna de sus cavidades, en una superficie al aire libre o en una zona cerrada y protegida de las inclemencias del tiempo.

Con respecto de este último punto (DiMaio y DiMaio 2001) señalan que dentro del organismo de un ser humano vivo los espermatozoides conservan su movilidad alrededor de 6 horas, ocasionalmente 12 horas y muy rara vez durante 24 horas. De presentarse este último caso es probable que la muestra se haya levantado del moco cervical – ya que en él los espermatozoides logran un tiempo mayor de supervivencia que en la vagina -, por ello cuando se intenta localizar semen en individuos que aleguen haber sufrido una violación sexual apenas unas

horas antes de ser examinados por el médico forense, es importante que se tomen muestras de la vagina y no sólo del cérvix o cuello uterino.

Entonces, si la víctima declara que su última relación coital consentida se realizó varios días antes de la agresión y se logra la identificación de gran cantidad de espermatozoides móviles en los frotis anales o vaginales, el semen levantado evidencia un acceso carnal reciente, que analizado junto a otros elementos de prueba como el examen médico legal y la misma declaración de la víctima, puede ser consistente con un delito de violación reciente; mientras que si el fluido presenta muy pocos espermatozoides móviles o espermatozoides no móviles en mayor concentración, la muestra pudo haber sido tomada del cérvix, lo que sugiere que estos han estado dentro de la cavidad desde 2 ó 3 días antes del levantamiento.

Cuando no haya sido posible realizar un conteo de células coloreadas debe tomarse en cuenta alguna de estas posibilidades:

- La muestra analizada no se trata de semen.
- La muestra analizada es semen de un donador azoospermico, es decir, aquel cuyo semen carece totalmente de espermatozoides.
- Existió algún problema en la técnica realizada.

De acuerdo con (Tilstone, et. al., 2006) en aquellos casos donde se presuma la presencia de semen de otras especies animales debe tomarse en consideración que éste no será fácilmente confundido con el del ser humano, pues tienen forma y tamaño distintos. Sin embargo, el autor menciona que existen dos excepciones: los simios y los perros.

Además, es importante tomar en consideración que esta técnica puede reaccionar con las levaduras - tiñéndolas de un color rojo uniforme - y con las células epiteliales – que adquieren una coloración violeta en el citoplasma y en el núcleo (Cerdas Ávila, 2010) sin embargo, por su estructura anatómica no son confundibles con los espermatozoides y por ende, el resultado de la pericia va a ser claro en este punto.

Debe considerarse también que los espermatozoides se adhieren fácil y fuertemente a diversos tejidos, (Saferstein, 2007) señala que incluso existen estudios en los que en muestras de unos 1000 espermatozoides sólo 4 pudieron extraerse de un trozo de algodón y ser observados bajo el microscopio. Entonces, es necesario tomar en cuenta la superficie sobre la cual se encuentra la muestra, pues si ésta es de algodón el conteo de espermatozoides podría verse comprometido.

Otra desventaja es que los espermatozoides son extremadamente frágiles cuando están en una muestra seca y se desintegran con gran facilidad si la mancha se lava o si se frota contra otra superficie, lo que puede suceder en el proceso de recolección y transporte de la muestra (Saferstein, 2007), sobre todo si ésta es antigua o ha sido recolectada mediante raspado, ya que en estos casos es muy probable que los espermatozoides sean destruidos (Vanegas González, 2002). Ante estas circunstancias es preferible optar por otras técnicas de recolección y buscar el embalaje idóneo para su transporte.

Por último, es importante considerar que de acuerdo con (Mozayani y Noziglia 2006) la técnica no es específica para espermatozoides humanos y su ejecución puede llevar más tiempo que otros métodos de detección, además, ante un resultado negativo no puede descartarse la posibilidad de que el donador del fluido esté vasectomizado o padezca alguna patología que afecte su conteo de espermatozoides, por lo que en estos casos el autor recomienda el análisis de proteína P30 antes de emitir un dictamen indicando la ausencia de semen en la muestra.

Planteamiento del problema:

La violación causa un estrés postraumático, el cual va a depender, en buena medida, de las diferencias individuales como: la edad, las habilidades de enfrentamiento ante situaciones difíciles, el apoyo social, la autoestima y las características del estímulo estresor (intensidad, frecuencia de aparición, conocimiento o no del agresor, agresión individual o grupal, lesiones físicas, etc.).

En pocas palabras, una violación siempre tendrá un gran impacto emocional, la magnitud dependerá, de la capacidad de superación de la persona afectada.

En México los casos de violación ocupan un lugar muy importante, ya que es el quinto delito más cometido (estadística de la ONU), la secretaria de Salud reporta aproximadamente 120 mil violaciones anuales, siendo el primer lugar a nivel mundial con más violaciones. En Puebla de acuerdo a estadísticas del INEGI en el 2013 se denunciaron 752 violaciones simples y 72 equiparadas.

En la Fiscalía General del Estado de Puebla, aproximadamente el 45% de los casos se relaciona con delitos sexuales y el 80% de los indicios que se reciben en este tipo de casos, son muestras seminales.

En estos indicios se buscan proteínas como: fosfatasa acida y p30, al igual que espermatozoides, pero estos indicios no llegan el día que son recabados, por lo tanto, es necesario plantearse la siguiente pregunta:

¿Hasta qué periodo de tiempo un indicio puede llegar a ser analizado y ser determinante en un dictamen?

Justificación:

Debido al gran impacto que tiene el delito de violación en las víctimas es importante actuar en el tema, ya que en base a la estadística solo el 15% de estos delitos son denunciados y solo el 5% son puestos a disposición del juez.

Los datos reportados en el Estado de Puebla son alarmantes, en 2013 se reportaron 824 violaciones (Estadística del INEGI). Al día de hoy la incidencia de estos eventos se ha ido incrementando un 5% anual (Datos de la Fiscalía General del Estado de Puebla), lo cual hace que la carga de trabajo en el Laboratorio de Genética Forense sea muy grande, debido a la cantidad de indicios de índole sexual que se reciben.

Actualmente en el Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla se utilizan técnicas como: fosfatasa ácida (prueba presuntiva), p30 y tinción de Christmas Tree (pruebas confirmatorias), para la identificación de semen y células espermáticas, de asuntos de carácter sexual y seleccionar así las muestras ideales para la obtención de un perfil genético.

Debido a lo anterior es necesario saber hasta qué momento es posible encontrar fosfatasa ácida o P30 en una muestra seminal, así como también células espermáticas mediante la tinción de Christmas Tree, en los indicios que llegan al laboratorio, en este caso hisopos.

Hipótesis nula

La presencia de fosfatasa acida, p30 y espermatozoides no se degradan con el paso del tiempo

Hipótesis alterna:

La presencia de fosfatasa acida, p30 y espermatozoides si se degrada con el paso del tiempo

Objetivos

General:

Identificar fosfatasa ácida, p30 y espermatozoides, recabadas en hisopos, a distintas diluciones y tiempo de almacenamiento.

Específicos:

- 1.- Semicuantificar la presencia de fosfatasa ácida.
- 2.- Semicuantificar la presencia de p30.
- 3.- Semicuantificar la presencia de espermatozoides.
- 4.- Relacionar los resultados obtenidos en fosfatasa ácida y p30, con la presencia de espermatozoides.

Metodología

Tipo de estudio:

Prospectivo, Transversal, Analítico y Observacional

Tipo de muestra:

Líquido seminal de donantes varones

Muestras a observar:

5 muestras seminales a las cuales se les realizara 3 diluciones utilizando solución salina isotónica al 0.9%

20 en total a distintos tiempos

Criterios de inclusión:

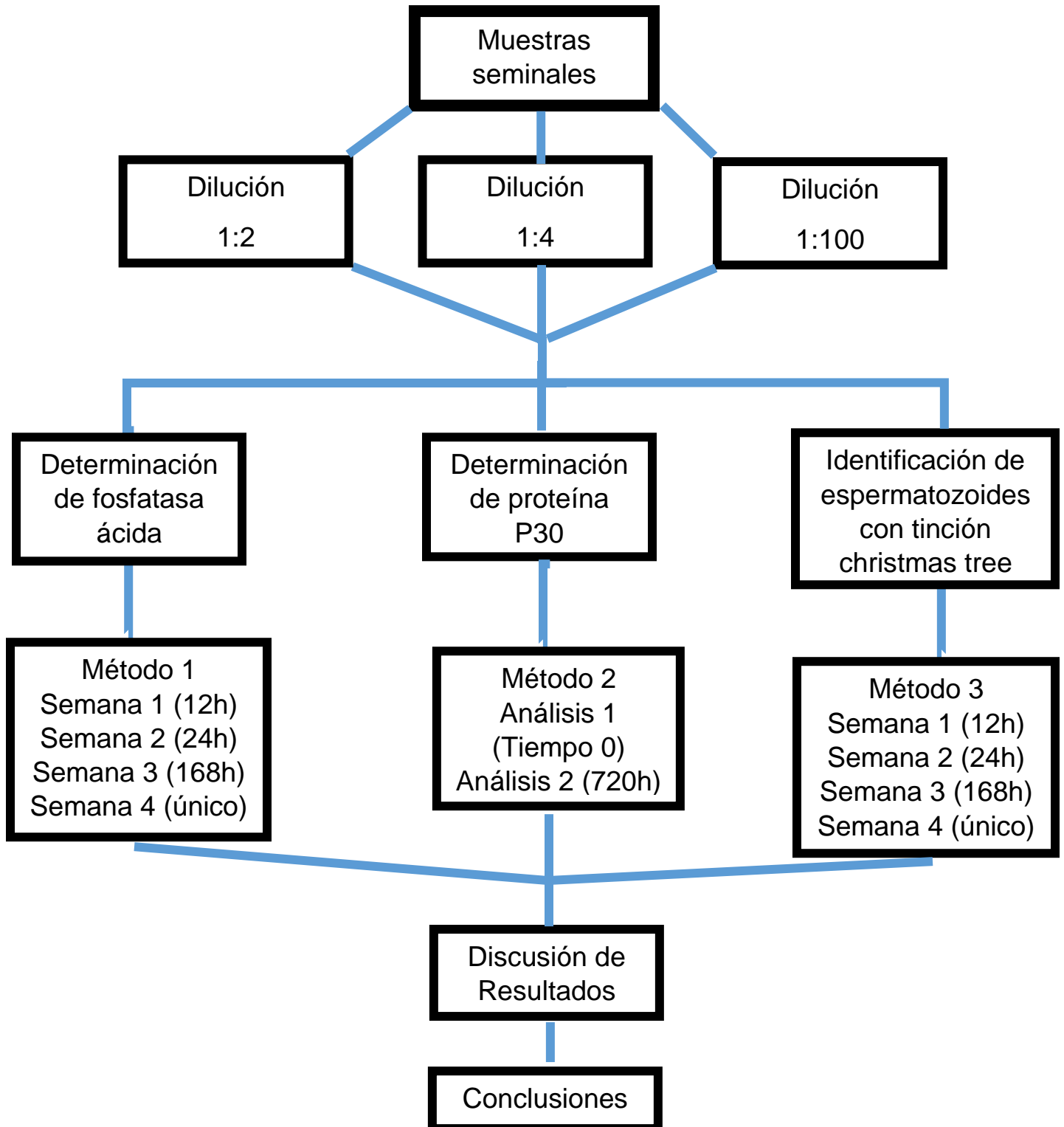
Varones 20 – 60 años

Criterios de exclusión:

Varones <20 años

Varones >60 años

Esquema de trabajo



Materiales:

- a) Portaobjetos
- b) Hisopos Protec (Plástico con punta de algodón)
- c) Micropipeta 200 - 1000mL Jencons Sealpette
- d) Puntas Estériles Finntip Electrón Corporation
- d) Tubos 1.5mL Eppendorf
- e) Tubos cónicos 15mL Axygen Scientific
- f) Gasas esteriles (10cmx10cm) 100% algodón Quirmex
- g) Bisturi
- h) Hojas de bisturi
- i) Papel kraft
- j) Vortex Genie
- k) Microscopio Imager Z2 con lente Carl Zeiss y software MetaSystems

Preparación de las muestras seminales:

Se utilizaran 5 muestras seminales de donantes, a los cuales se les proporcionara una carta consentimiento e indicaciones para obtener una muestra de calidad, por ejemplo: abstinencia a tener sexo o a masturbarse al menos por 3 días. Estas muestras serán recolectadas en un frasco estéril de plástico de boca ancha y serán remitidas al laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla.

En el laboratorio se analizan las muestras en hisopos. Por ello se tomaran 300 microlitros de cada muestra y se trasladaran a hisopos, con el fin de simular la cantidad de semen que se puede recolectar en un raspado vaginal o anal.

Estos hisopos una vez secos, se guardarán en bolsas de papel Kraft, en un lugar limpio y seco, a una temperatura de 21°C, con un 35% de humedad, durante un mes.

Nota: El secado se realizara dejando la muestra expuesta a la temperatura del laboratorio (21°C) en un tiempo de 12 horas, mismo tiempo que hay entre un análisis y otro.

Método 1

Se analizaron mediante la técnica de fosfatasa acida las diferentes muestras seminales originales y sus diluciones 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:100 (1%), de manera diaria en periodos de 12 horas durante una semana. En la segunda semana se realizó cada 24 horas y en la tercera solo realizó una vez el análisis hasta llegar a 4 semanas.

Identificación de fosfatasa acida:

Se utilizó el **Kit Fosfatasa acida de Seri Co.**

Este Kit consta del siguiente reactivo, que a su vez, se prepara de la siguiente manera:

Solución 1: 1 g de orto dianilsidina tetrazotizada + 20 g de acetato de sodio + 10 ml de ácido acético glacial + 100 ml de agua destilada.

Solución 2: 0.8 g de alfa naftil fosfato de sodio + 10 ml de agua destilada. Mezclar 10 ml de solución 1, 89 ml de agua destilada y 1 ml de solución 2. Refrigerar en frasco ámbar.

Procedimiento:

1.- Cortar un tercio del hisopo con el cual se tomó la muestra o bien entre 3mm – 5mm se coloca en una gasa estéril, lo mismo se hace con material igual no

manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como control (testigo positivo).

2.-Se colocan cada uno en tubos eppendorf previamente rotulados: mancha problema, blanco y control

3.- Inmediatamente, agregar 200 microlitros de buffer y dejar pasar 30 segundos

4.- Agregar 3 - 4 gotas de reactivo a cada una de las muestras.

Interpretación de los resultados:

La aparición de un color violeta intenso en la muestra problema dentro de un tiempo no mayor a 5 minutos, indicará la presencia de fosfatasa ácida en cantidades mayores a 20 U/L., y por lo tanto, la muy probable presencia de semen; en el control siempre aparecerá el color señalado, tonalidad que no debe aparecer en el blanco.

Método 2

Se analizaron mediante la técnica de P30 las diferentes muestras originales y sus diluciones 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:100 (1%), a tiempo cero, y a las 4 semanas

Identificación de p30:

Se utilizó el **Kit P30 Abacard**

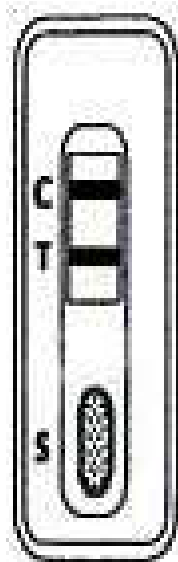
Para la preparación de la muestra y extracción es necesario seguir los siguientes pasos:

1. En un microtubo colocar 750µl de buffer de extracción. La extracción de muestras de hisopos (corte longitudinal) o manchas (corte aprox. 3mm ó 5mm).

2. Agitar en un dispositivo Vortex por 5 segundos.

3. Colocar en refrigeración por dos horas (2-8°C). Este procedimiento recupera aproximadamente el 99% de p30 extraída del hisopo.
4. Dejar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
5. Centrifugue la muestra 3 minutos a 3.600 rpm después del paso de extracción.
6. Remover el dispositivo y el gotero del paquete sellado.
7. Etiquetar el dispositivo con el número de caso.
8. Adicionar 300ul (6-7gotas con el gotero) de la muestra al pocillo "S" del dispositivo.
9. Leer los resultados a los 10 minutos.
10. Esta alícuota podría ser almacenada entre 2-8°C sino se usa inmediatamente.

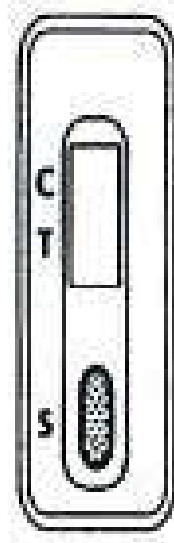
Los resultados positivos se pueden observar a los 10 minutos



POSITIVO



NEGATIVO



INVALIDO

Método 3

Se realizaron frotis con la finalidad de identificar espermatozoides utilizando la tinción "CHRISTMAS TREE".

Identificación de espermatozoides:

Se utilizaron los **Reactivos A y B X-MAS TREE**

Para realizar la tinción se deben seguir estos pasos:

1.- Una vez fijado el frotis, añadir dos gotas de rojo rápido nuclear y dejarlo reposar en cámara húmeda durante 15 minutos (puede utilizarse una caja de petri colocando en la base y el interior de la tapa un papel filtro húmedo.)

2.- Lavar con agua desionizada durante 5 segundos

3.- Añadir una gota del colorante b y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos.

4.- Lavar con etanol absoluto para decolorar.

5.- Dejar secar por 5 minutos.

Interpretación:

Al observar al microscopio (100X), el núcleo del espermatozoide aparecerá en color rojo, el acrosoma y la cola de color verde.

RESULTADOS

En este proyecto se utilizaron las siguientes muestras:

Muestra	Edad donador
1	27 años
2	29 años
3	42 años
4	22 años
5	60 años

Mismas que se trabajaron inmediatamente al ser recibidas y se obtuvieron los siguientes resultados:

Fosfatasa Ácida																					
Muestras																					
Semana 1		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
20 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
26 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 1.- Resultados de fosfatasa ácida obtenidos en la primera semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

Se puede apreciar que a partir del 6to día la fosfatasa ácida comienza a degradarse, (Dilución 1:100) primero en 2 de las 5 muestras y después lo hace en las 5, mientras que en las demás diluciones estas se mantiene presente.

Fosfatasa Ácida																					
Muestras																					
Semana 2		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
27 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
28 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
29 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
30 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	

Tabla 2.- Resultados de fosfatasa ácida obtenidos en la segunda semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

Se observa, que efectivamente la fosfatasa acida para la dilución 1:100 ya no está presente. También se aprecia que a partir del día 13 (Dilución 1:4) esta comienza a perderse en la muestra 5, en el día 14 en la muestra 3 y 5.

Fosfatasa Ácida																					
Muestras																					
Semana 3		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
4 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3.- Resultados de fosfatasa ácida obtenidos en la tercera semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En esta tabla se puede apreciar que la fosfatasa acida, se ha perdido totalmente en las diluciones 1:4 y 1:100.

Fosfatasa Ácida																					
Muestras																					
Semana 4		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

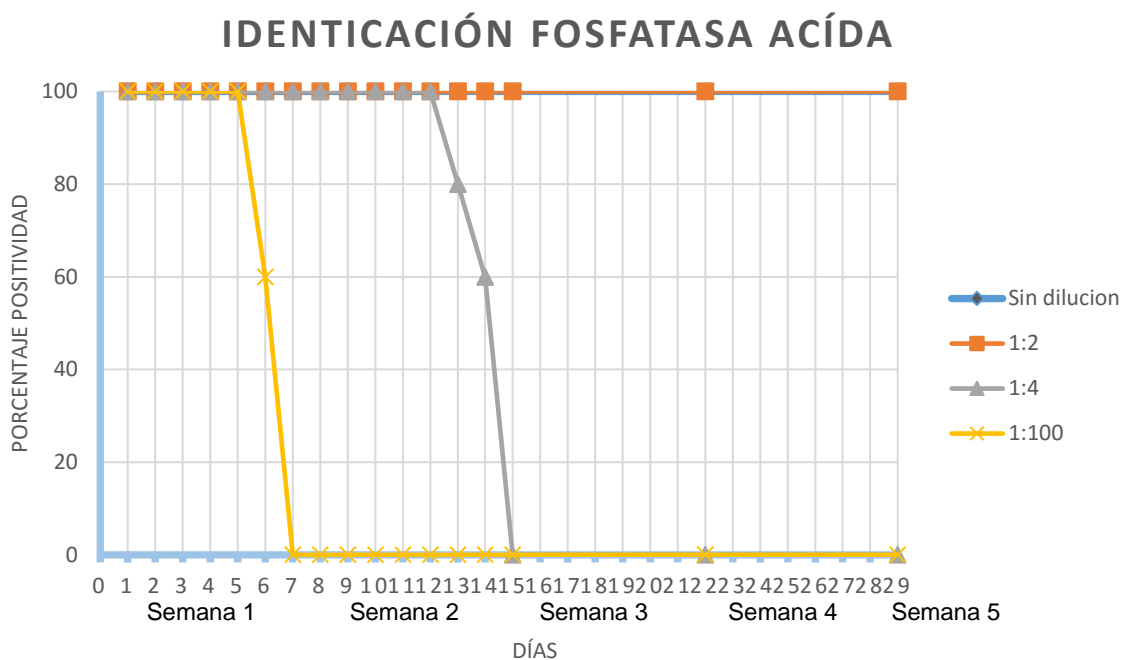
Tabla 4.- Resultados de fosfatasa ácida obtenidos en la cuarta semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En esta tabla se aprecia que la proteína sigue presente en la dilución 1:2

Fosfatasa Ácida																					
Muestras																					
Semana 5		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
18 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5.- Resultados de fosfatasa ácida obtenidos en la quinta semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En la tabla se puede notar que el comportamiento se mantiene igual que el obtenido en la semana anterior



Gráfica 1.- Comparación del comportamiento de la fosfatasa ácida, de las muestras control y las muestras diluidas, durante el periodo de estudio.

En la gráfica se analizan todas las muestras conforme al paso de los días, lo que ayuda a obtener un porcentaje de positividad, esto nos permite apreciar que a partir del sexto día la fosfatasa ha caído al 60% de positividad y en el día 7 cae hasta el 0%

Para la semana 2 las demás diluciones se mantienen al 100%, pero en el día 13 la fosfatasa ácida comienza a caer al 80%, luego al 60% al día 14 y al 0% para el comienzo de la 3er semana (día 15)

Cabe destacar que desde el día 1 hasta el día 29 (inicio de la 5ta semana) la fosfatasa se mantiene al 100% en la dilución 1:2 y en el control.

Proteína p30																					
Muestras																					
Análisis 1		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
20 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 6.- Resultados de proteína P30, obtenidos en el primer análisis, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

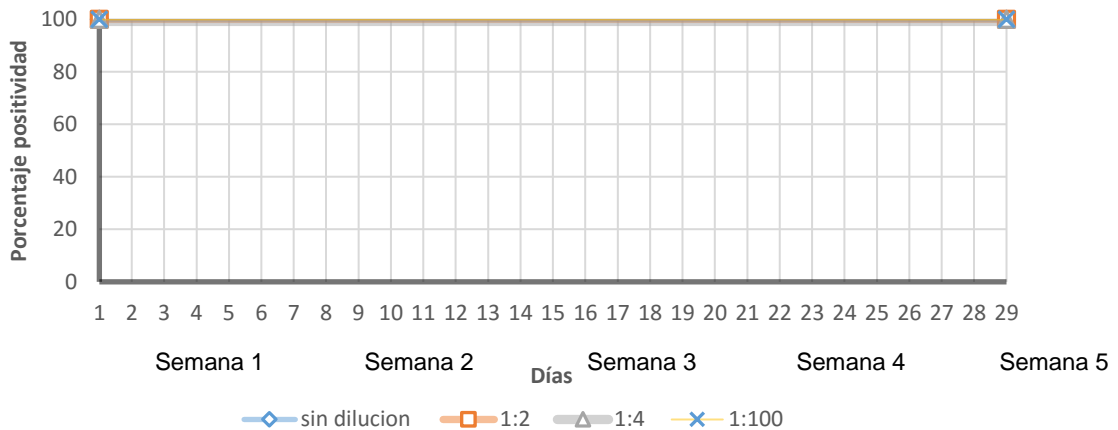
En esta tabla se puede apreciar que p30 está presente, tanto en todas las muestras, como en todas las diluciones.

Proteína p30																					
Muestras																					
Análisis 2		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
18 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 7.- Resultados de proteína P30 obtenidos en el segundo análisis, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

Esta tabla nos muestra que la p30 todavía es detectable al 100%, aun en la dilución 1:100, a pesar de que han transcurrido 29 días.

Identificación proteína p30



Grafica 2.- Comparación del comportamiento de la proteína P30, de las muestras control y las muestras diluidas, durante el periodo de estudio.

En el grafico se observa que p30 sigue 100% detectable, sin importar la dilución utilizada.

Tinción Christmas Tree																					
Muestras																					
Semana 1		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
20 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
21 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
22 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
23 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
24 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
26 Abril	09:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabla 8.- Resultados de identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree, obtenidos en la primera semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En esta tabla se representan todos los resultados obtenidos en la primera semana, y se observa, que los espermatozoides están presentes, tanto en todas las muestras, como en todas las diluciones.

Tinción Christmas Tree																					
Muestras																					
Semana 2		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
27 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
28 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
29 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30 Abril	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
2 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
3 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	

Tabla 9.- Resultados de identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree, obtenidos en la segunda semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En esta tabla se muestran los resultados obtenidos en la segunda semana y se observa, se aprecia que a partir del día 12 (Dilución 1:100) los espermatozoides comienzan a degradarse en la muestra 5, en el día 14 ocurre lo mismo con la muestra 3.

Tinción Christmas Tree																					
Muestras																					
Semana 3		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
4 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-

Tabla 10.- Resultados de identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree, obtenidos en la tercera semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En esta tabla se puede apreciar que los espermatozoides, en la dilución 1:100 han dejado de ser identificables para la muestra 3 y 5.

Tinción Christmas Tree																					
Muestras																					
Semana 4		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 11.- Resultados de identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree, obtenidos en la cuarta semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

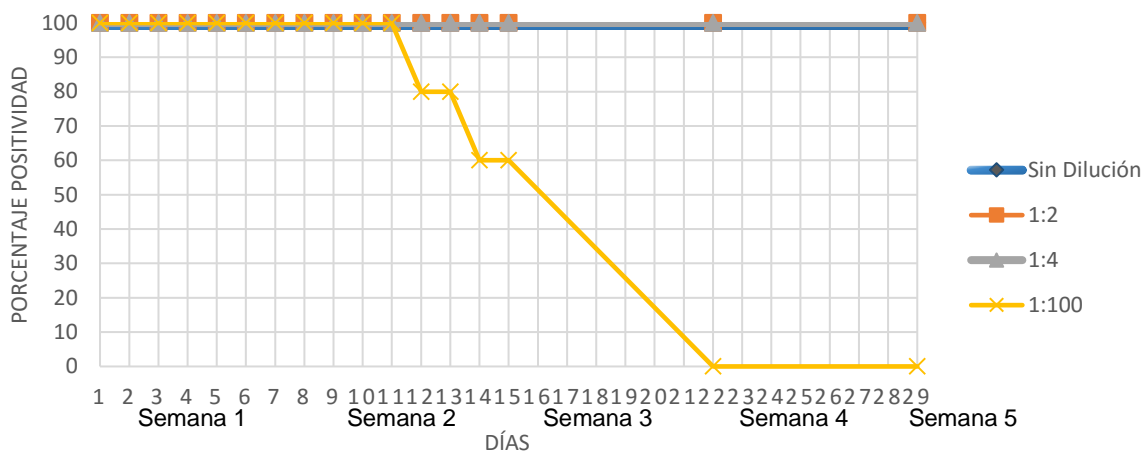
En esta tabla se aprecia, que en la dilución 1:100 ya ninguna muestra permite la identificación espermática.

Tinción Christmas Tree																					
Muestras																					
Semana 5		Sin dilución					1:2 (50%)					1:4 (25%)					1:100 (1%)				
Día	Hora	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
18 Mayo	21:00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 12.- Resultados de identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree, obtenidos en la quinta semana, abarcando, tanto las muestras con y sin dilución.

En la tabla se observa que para la dilución 1:2 y 1:4, los espermatozoides aún son identificables.

IDENTIFICACIÓN ESPERMÁTICA



Grafica 3.- Comparación del comportamiento de la identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree, de las muestras control y las muestras diluidas, durante el periodo de estudio.

En el grafico se observa que durante la primera semana los espermatozoides eran identificables para cualquier dilución, pero, a partir de la segunda semana (día 12) comienzan a degradarse en la dilución 1:100 cayendo hasta un 80% y posteriormente a 60% (día 14).

Al inicio de la semana 3 se observa que los espermatozoides siguen siendo identificables en la dilución 1:4, mientras que en la dilución 1:100 se mantiene en 60%

Para la semana 4 y 5 los espermatozoides continúan presentes tanto en la dilución 1:4, como en la 1:2, al igual que en el control. Pero en la dilución 1:100 ya no son identificables.

Discusión de resultados:

Fosfatasa ácida

En esta técnica se observó que a partir del día 7 en una dilución 1:100 la proteína ya no es detectable. Posteriormente la proteína deja de ser detectable en la dilución 1:4 a partir del día 13, y finalmente desaparece completamente el día 15. En cambio, en la dilución 1:2 y las muestras sin diluir, la proteína seguía siendo detectable. Con esto notamos que una dilución 1:2 no se ve tan afectada por el fluido vaginal como se esperaba, ya que su comportamiento es muy similar al de una muestra sin diluir.

Cabe mencionar que se trabajaron 5 muestras a la vez y que cada una se comportó de forma diferente.

Por ejemplo: en el día 6 la proteína ya no es detectable, la proteína en la dilución 1:100, para las muestras 3 y 5, es hasta el día 7 que las demás muestras también hacen lo mismo.

Todo esto es justificable ya que la muestra 3 pertenece a un sujeto de 42 años y la muestra 5 a uno de 60 años. Con este experimento se observó que la cantidad de espermatozoides va descendiendo conforme el paso de los años así como la calidad de los mismos, de igual manera esto sucede con las proteínas presentes en líquido seminal, van perdiendo su concentración, lo cual se corrobora con lo dicho por Slotter, E. 2006 y Almaral, H. 2008 donde realizó un análisis cuantitativo.

Aunque la fosfatasa ácida no sea una proteína muy específica, (ya que se encuentra en otros fluidos), su concentración en líquido seminal es mucho mayor que en cualquier otro sitio.

Esta a su vez es la prueba menos confiable y el menos sensible, porque la proteína deja de ser detectable muy pronto, más en las diluciones 1:100 donde la concentración de la proteína es muy baja, además, se degrada rápidamente aun a pesar de que esta conservado en condiciones controladas, incluso en la dilución 1:4.

Dilución	Tiempo de detectabilidad
1:2	Más de un mes
1:4	Hasta 15 días
1:100	Hasta 7 días
Control	Más de un mes

Todo esto, conservando la muestra en hisopos y en las condiciones ya antes mencionadas.

P30

Para esta técnica se notó que aun a pesar del paso del tiempo y de las diluciones esta proteína sigue siendo detectable, lo que nos indica que su concentración en líquido seminal es muy alta (820000ng/ml) y es muy difícil que se degrade.

Tal y como lo reportaba la bibliografía, esta proteína se puede encontrar aun a pesar del paso de los años (hasta 30 años), lo que si nunca se menciona son las condiciones en las que se trabajaba, ni como se habían conservado las muestras.

Sin duda, es una proteína muy importante, para el área forense, es un gran marcador, muy específico, pareciera que no se degrada, cuando esta se conserva bien. Esto se debe a que la concentración de p30 en líquido seminal, es muy alta 820000ng/ml, el kit es capaz de detectarla ya que utiliza un buffer, que a la vez diluye la muestra. Le bastan solo 4ng para detectarla, tal y como lo comprueban los artículos de (Kristaly, A 1998) y (Manfred N. y colaboradores, 1999), que incluso utilizaron diluciones 1:1 000 000, así como pacientes azoospermicos, series de combinaciones, semen – sangre, semen – saliva, semen – fluido vaginal y semen – saliva – sangre. Y variaciones de tamaño de la muestra, ya que utilizaron también recortes de prendas.

P30 es la prueba de oro, su sensibilidad, especificidad y durabilidad son factores altamente importantes, es una proteína que no se ve tan afectada por la edad de la persona, ni por si esta es azoospermica, una vez que se recaba o se conserva, en hisopos o prendas, es extremadamente difícil que esta se degrade, además de que el método utilizado para su detección, es muy puntual ya que se da a través de la unión anticuerpo – antígeno – anticuerpo, a comparación de los otros métodos.

El único detalle de este método, es que, es el más costoso de los 3, lo que hace que no sea un método muy accesible para el analista.

Christmas Tree

En esta técnica se observó que la degradación espermática se da a partir del día 9 en las muestras 3 y 5, en la dilución 1:100, para el día 11 se han perdido en todas las muestras.

Esto se debe a que los donantes de estas muestras son de entre 40 y 60 años de edad, y por lo tanto, la cantidad de espermatozoides, es menor, lo que hace que la detectabilidad se vaya reduciendo, tomando en cuenta que el material del hisopo también puede afectar los resultados, ya que es algodón y este puede hacer que los espermatozoides queden atrapados, lo recomendable seria hacer lo que

sugiere (Cerdas Ávila, 2010), rehidratar la muestra en agitación continua durante un periodo de 2 a 12 horas.

En las demás diluciones, los espermatozoides siguieron siendo detectables, durante todo el tiempo del análisis.

Christmas tree es nuestra segunda mejor opción, en primera porque es mucho más barato que la p30, y además de que el tiempo de detectabilidad es muy similar al de p30, porque en un muestra seminal la cantidad de espermatozoides que puede haber, asciende a millones, por ello el método no se ve tan afectado cuando se realizan diluciones. En la siguiente tabla se muestra hasta qué tiempo se pueden detectar y en que dilución.

Dilución	Tiempo de detectabilidad
1:2	Más de un mes
1:4	Más de un mes
1:100	Entre 15 y 22 días
Control	Más de un mes

El único inconveniente para este método, es que no abarca a personas azoospermicas o vasectomizadas, por ende, no se observaran espermatozoides.

En conjunto, durante este proyecto, no solo confirmamos que método es más confiable de los 3, también se observó la sensibilidad de cada uno. Si bien todos en un inicio dan resultados positivos, nuestra pregunta principal era: ¿Hasta qué momento dejaran de hacerlo?

Gracias a este proyecto no solo podemos dar respuesta a esta pregunta, sino que además, hemos realizado un gran aporte a la ciencia, ya que ahora conocemos el tiempo en el que las proteínas y espermatozoides siguen siendo detectables en condiciones in situ.

Conclusiones:

1.- La técnica de fosfatasa acida, solamente es muy útil cuando se trabaja con muestras seminales que vayan de 100% - 50% de concentración.

2.- La técnica de P30 es una prueba concreta, ya que su sensibilidad y especificidad es muy alta.

3.- La técnica de christmas tree es que la segunda prueba más confiable, ya que aún se pueden encontrar espermatozoides en una dilución 1:4, durante todo el experimento, pero no en la 1:100.

4.- En una muestra seminal el primer factor que se degrada conforme el paso del tiempo y/o la edad, es la fosfatasa acida, ya que en primera no es muy específica, además de que es, por lo menos 100 veces menos sensible que la p30. El segundo factor en degradarse, son los espermatozoides, mientras que la p30 no se degrada en días, meses o años, sino en décadas.

Recomendaciones:

Para poder decidir que método utilizar se recomienda tomar mucho en cuenta el número de días, que pasaron entre la recabacion y el análisis de la muestra. Por ejemplo: si una muestra tiene una antigüedad de 3 – 5 días se puede utilizar cualquiera de los 3 métodos, pero si esta tiene una antigüedad de más de 15 se recomienda utilizar el método de Christmas tree, si este lanza un resultado negativo, habría que repetir la prueba, pero, ahora dejando la muestra durante más tiempo y en agitación continua, con el fin de aumentar la posibilidad de obtener espermatozoides a la hora del análisis, y en el caso de que la muestra tenga una antigüedad mayor a 22 días o un mes se recomienda utilizar el método de p30.

En dado caso también se deberá tomar en cuenta los datos de la persona agresora, ya que si esta es azoospermica o vasectomizada, entonces no tendría caso utilizar el método de Christmas tree y se iría directamente al método p30.

Bibliografía:

Amaral Rodríguez, H., E. (2008) **Cuantificación de la fosfatasa acida total y prostática, y su importancia en la investigación forense.** Ciencias forenses. Vol. 15, No. 3 pp 93 – 117.

Cerdas A, L., López M., T., Espinoza E., M. (2005) **El papel de la sección de bioquímica en la investigación por agresión sexual en Costa Rica,** Revista Judicial, 84, 133 – 138.

Cerdas Ávila, L. **La investigación forense en los delitos sexuales.** En Salas Zúñiga, M. (2010) Manual de Ciencias Forenses. Heredia, Costa Rica: Departamento de Artes Gráficas del Poder Judicial.

Chacón Méndez, K. (2010). **Evaluación de las técnicas de extracción y detección de semen utilizadas en el análisis de aplicadores anatómicos en la investigación forense de delitos sexuales.** (Tesis de licenciatura inédita). Universidad de Costa Rica, San José.

Código Penal de la Federación (2016). Vigente al 7 de abril de 2016

DiMaio, V. J. y DiMaio, D. (2001). **Forensic Pathology. Practical aspects of criminal and forensic investigation.** Florida, Estados Unidos de América: CRC Press.

Distribuidora Comercial Zogbi. (2013). **ABAcad p30 prueba para identificación forense de semen.** Recuperado de <http://www.dczogbi.com/placas.html> el día 3 de marzo de 2016.

Elkis, K. M. (2013) **Forensic DNA Biology.** Massachusetts, Estados Unidos de América: Academic Press. Recuperado de: DOI: 10.1016/B978-0-12-394585-3.00002-X el día 6 de Marzo de 2016.

E.Sloter, T.E.Schmid, F.Marchetti, B.Eskenazi, J.Nath and A.J.Wyrobek. (2006). **Quantitative effects of male age on sperm motion.** Human reproduction. Vol. 21, No. 11 pp. 2868 – 2875

Fernández Cruz José Ángel. (2013). **Los delitos de violación y estupro del artículo 365 bis código penal: una racionalización desde el mandato de lex stricta y el principio de lesividad. Especial referencia a la introducción de dedos u otras partes del cuerpo.** Revista ius et praxis - N° 2: 105 – 135

Gaensslen, R. E. (1983). **Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry.** Washington, Estados Unidos de América: U.S. Department of Justice.

Granja, J. & Macchi, J. (2001). **Tratado de criminalística. Tomo II. La química analítica en la investigación del delito.** Capítulo V. Pag. 271 Buenos Aires: Policial.

Guzmán J. (2000) **Manual de criminalística.** La Roca. Buenos Aires.

Hernández L. (2011). **México es el primer lugar en violencia sexual: ONU. Periódico Excelsior.** Ciudad de México, México. Publicado en la edición del 25 de Diciembre de 2011

Hochmeister, M., Budowle, B., Rudin, O., Gehrig, C., Borer, U., Thali, M., Dirnhofer, R. (1999) **Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid.** Journal of Forensic Sciences, 44, 1057 – 1060.

Kristaly, A., BS and Smith, D. A. S., (1998) **Validation of the OneStep ABACard™ PSA test for the rapid forensic identification of semen.** MSFS, Forensic Biology Section, Crime Laboratory Bureau, Miami-Dade Police Department, Miami, Florida.

Lencioni, L. (2002). **Los delitos sexuales, manual de investigación pericial para médicos y abogados.** México: Trillas.

Mozayani, A. y Noziglia, C. (2006). **The forensic laboratory handbook procedures and practice.** New Jersey, Estados Unidos de América: Humana Press.

Muniyan, Sakthivel; Nagendra Chatuverdi, Jennifer Dwyer, Chad LaGrange (2013). **Human Prostatic Acid Phosphatase: Structure, Function and Regulation.** International Journal of Molecular Sciences 14: 10438–10464.

Romero Montoya, L. Martínez Rodríguez, H., Pérez, M. A., Argüello García, R. (2011) **Relationship of spermatology, prostatic acid phosphatase activity and prostate specific antigen (p30) assays with further DNA typing in forensic samples from rape cases.** Forensic Science International, 206, 111 – 118.

Saferstein, R. (2007) **Criminalistics, an introduction to forensic science.** New Jersey, Estados Unidos de América: Prentice Hall.

Sergio E. Quispe; Silvia Tarifa, Rubén Solíz, Armando Sierra. (2010) **Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense.** BIOFARBO v.18 n.2: 1813-5363

Silveyra, Jorge O. (2006) **Sistemas de identificación humana** 1ra edición. Ed. La Rocca, Buenos Aires, Argentina.

Tilstone, W., Savage K., y Clark, L. (2006). **Forensic Science an encyclopedia of history, methods, and techniques.** California, Estados Unidos de América: ABC-CLIO.

Torres, Y., Aler, M., Plata, A., Domínguez, A., Sanz, P. y Gisbert, M. (2007) **Factores que afectan al análisis biológico de las muestras de agresiones sexuales,** Cuadernos de Medicina Forense, 47, 45-56.

Vanegas González, A. L. (2002) **Huellas Forenses, Manual de pautas y procedimientos en medicina forense.** Medellín, Colombia: Biblioteca Jurídica Dike.

ANEXOS



Figura 1.- Análisis del día 1 en la prueba de fosfatasa ácida.

Aquí se observa que tanto las muestras con y sin dilución dan un resultado positivo



Figura 2.- Análisis del día 6 (21:00) en la prueba de fosfatasa ácida.

Aquí se observa que en este análisis las muestras con dilución 1:100 dan resultados negativos



Figura 3.- Análisis del día 15

En esta imagen se observa que ahora también las muestras con dilución 1:4 dan resultados negativos



Figura 4.- Análisis 1 para la prueba de proteína P30.

En esta figura se demuestra que tanto las muestras con y sin dilución dan resultados positivos.

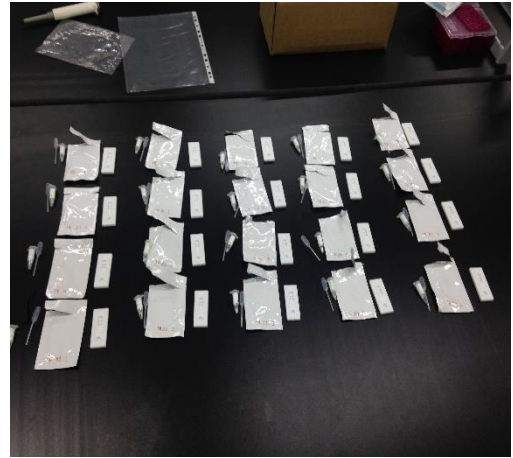


Figura 5.- Análisis 2 para la prueba de proteína P30.

En esta figura se demuestra que tanto las muestras con y sin dilución continúan dando resultados positivos, a pesar del tiempo.

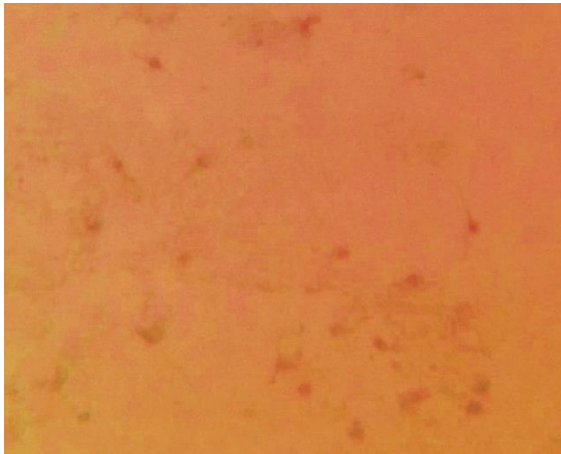


Figura 6.- Análisis día 3 (Sin dilución) Muestra 4 en la identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree.

Aquí se observa que la presencia de espermatozoides es muy abundante aun en el tercer día

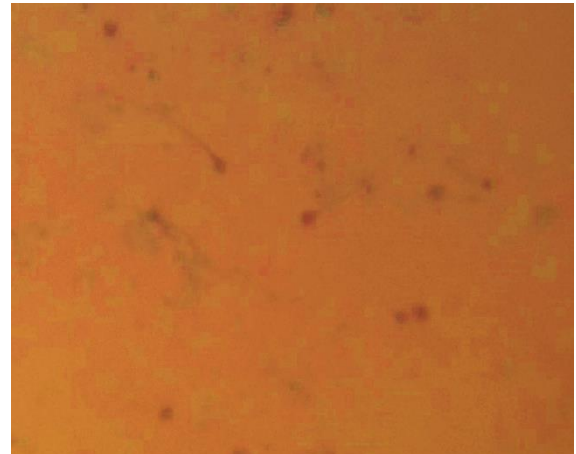


Figura 7.- Análisis día 5 (Dilución 1:4) Muestra 5 en la identificación espermática utilizando la tinción de Christmas tree.

Aquí se observa que la presencia de espermatozoides es abundante, aun a pesar de ser una dilución 1:4



Figura 8.- Análisis Día 15 (1:100)
Muestra 3 en la identificación
espermática utilizando la tinción de
Christmas tree.

En esta figura se demuestra que
ya no es posible la identificación
espermática para este día y esta
dilución

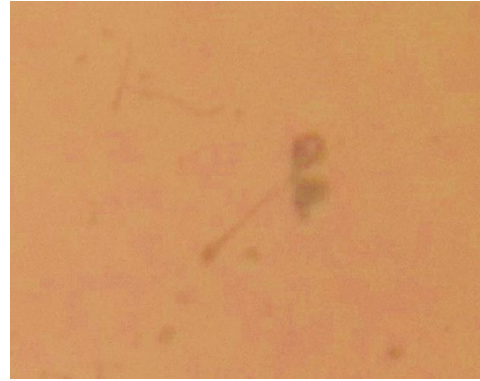


Figura 9.- Análisis Día 22 (1:4)
Muestra 5 en la identificación
espermática utilizando la tinción de
Christmas tree.

En esta figura se observa que la
identificación de espermatozoides
sigue resultando positiva, a pesar
de que han transcurrido más días
y tratarse de una dilución 1:4

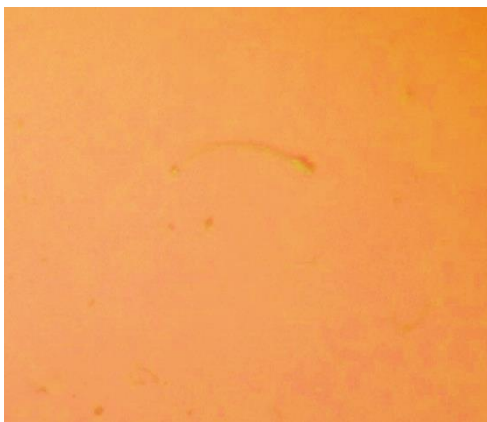


Figura 10.- Análisis Día 28 (1:2)
Muestra 5 en la identificación
espermática utilizando la tinción de
Christmas tree.

Aquí se observa que comienza a
ser más difícil la identificación y
solo se aprecia un espermatozoide
por campo para esta dilución y
muestra.



Figura 11.- Análisis Día 28 (1:4)
Muestra 1 en la identificación
espermática utilizando la tinción de
Christmas tree.

En la figura se observa que los
espermatozoides han perdido su
flagelo, pero siguen siendo
identificables para esta dilución y
muestra.