

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA INMUNOLÓGICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN MUESTRAS FORENSES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
HUGO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Q.F.B. VALENTIN ISLAS PÉREZ

MÉXICO D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

En especial al Q. F. B. Miguel Antonio Pérez Velásquez por dedicar parte de su tiempo en la asesoría de este trabajo, a los profesores de la FES Zaragoza que compartieron parte de sus conocimientos durante el desarrollo de mi carrera, y a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente en ella.

INDICE

	Pagina
1. Introducción - - - - -	3
2. Resumen - - - - -	6
3. Marco teórico - - - - -	7
3.1. Aspecto legal de la intervención del perito químico y del delito sexual - - -	7
3.2. Aparato reproductor masculino - - - - -	13
3.2.1. Escroto - - - - -	13
3.2.2. Testículo - - - - -	13
3.2.3. Conducto de los testículos - - - - -	15
3.2.4. Epidídimo - - - - -	15
3.2.5. Conductos deferentes - - - - -	16
3.2.6. Vesícula seminal - - - - -	17
3.2.7. Glándula bulbo uretral - - - - -	18
3.2.8. Próstata - - - - -	19
3.3. Semen (características y composición) - - - - -	20
3.4. Erección, emisión y eyaculación. - - - - -	22
3.5. Antígeno específico prostático (PSA). - - - - -	23
4. Técnicas de orientación para la identificación de semen - - - - -	24
4.1. Fluorescencia a la luz ultravioleta. - - - - -	24
4.2 Técnica de la fosfatasa ácida. - - - - -	24
5. Técnicas de confirmación para la identificación de semen - - - - -	26
5.1. Tinción de Gram - - - - -	27
5.2. Tinción de azul de metileno - - - - -	28
5.3. Tinción de Christmas Tree - - - - -	29
5.4. Técnicas inmunológicas usadas para la identificación del PSA o p30 - -	30
5.4.1. Inmunolectroforesis- - - - -	30
5.4.2. Inmunolectroforesis doble unidimensional - - - - -	33
5.4.3. Enzimoinmunoanálisis - - - - -	34
5.4.3.1. Homogéneo - - - - -	34
5.4.3.1. Heterogéneo (ELISA: indirecta, emparejado y competitivo) - - - - -	34
5.4.4. Inmunofluorescencia - - - - -	39

5.5. Inmunoensayo ABACard p30 para la detección cualitativa de proteína p30 en la identificación forense de semen	39
5.5.1. Principio de la técnica	39
5.5.2. Reactivos y materiales provistos	40
5.5.3. Estabilidad y almacenamiento	40
5.5.4. Protocolo de la prueba	40
5.5.5. Control de calidad	41
5.5.6. Sensibilidad	41
6. Planteamiento del problema	42
7. Objetivos	43
8. Hipótesis	43
9. Metodología	44
9.1. Evaluación de la sensibilidad de la placa inmunológica ABACard p30	44
9.2. Prueba para la especificidad de la placa ABACard p30, con fluidos biológicos distintos al semen.	47
9.3. Análisis de la efectividad de la placa ABACard p30 en indicios en la que se presume la existencia de semen.	48
10. Análisis de los resultados	56
11. Conclusiones	60
12. Bibliografía	61

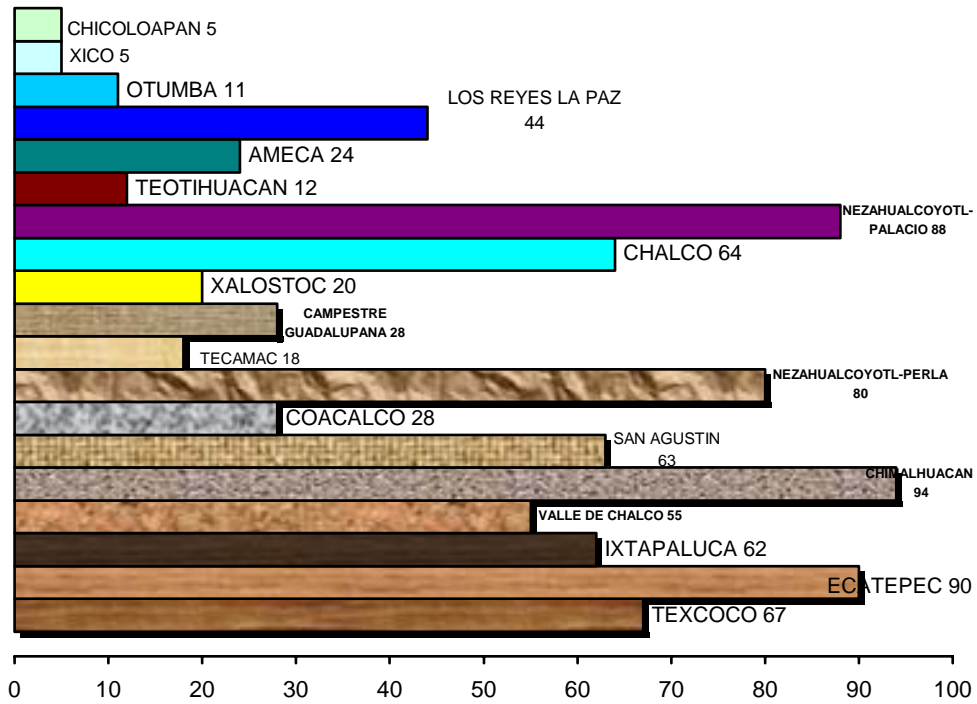
1.0 INTRODUCCIÓN

Los llamados delitos sexuales integran una de las especies más frecuentes en nuestro contexto social, cuya incidencia, por desgracia tiende a incrementarse. En el laboratorio de Química Forense del Instituto de Servicios Periciales con Sede en Texcoco. Se tienen registros de las muestras analizadas para la identificación de semen del periodo que comprende el año 2005 y 2006, obteniéndose los siguientes datos (tabla 1):

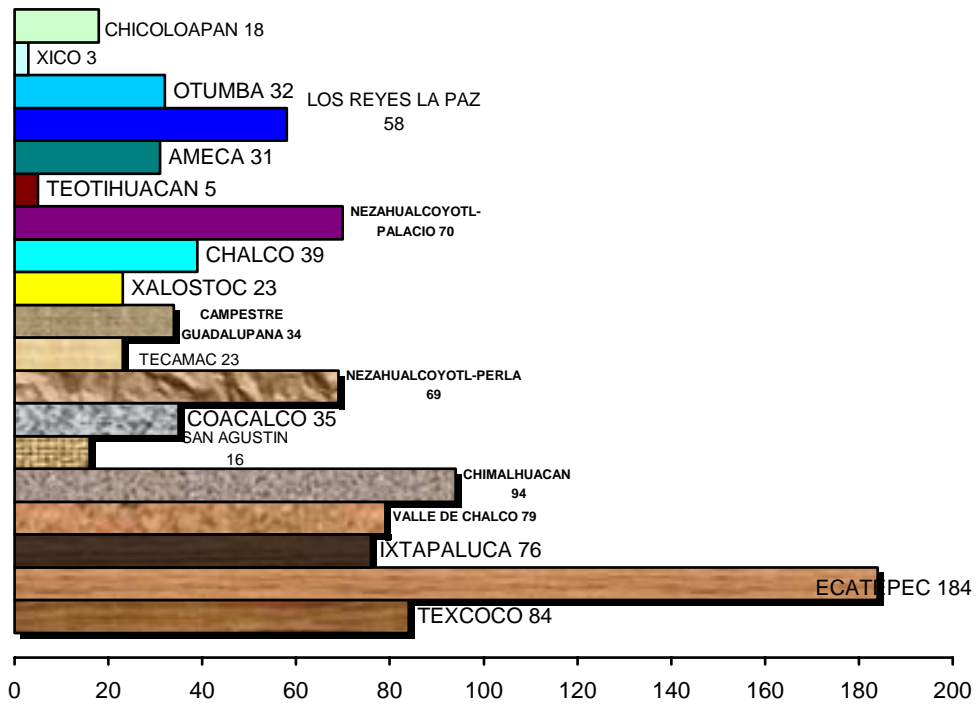
CENTROS DE JUSTICIA	2005	2006
TEXCOCO	67	84
ECATEPEC	90	184
IXTAPALUCA	62	76
VALLE DE CHALCO	55	79
CHIMALHUACAN	94	94
SAN AGUSTIN	63	16
COACALCO	28	35
NEZAHUALCOYOTL-PERLA	80	69
TECAMAC	18	23
CAMPESTRE GUADALUPANA	28	34
XALOSTOC	20	23
CHALCO	64	39
NEZAHUALCOYOTL-PALACIO	88	70
TEOTIHUACAN	12	5
AMECA	24	31
LOS REYES LA PAZ	44	58
OTUMBA	11	32
XICO	5	3
CHICOLOAPAN	5	18
TOTAL DE MUESTRAS	858	973

El laboratorio de química forense en Texcoco apoya a 19 centros de justicia que se encuentran distribuidas al norte y oriente del Estado de México.

Muestras analizadas durante el 2005



Muestras analizadas durante el 2006



Consecuentemente es de primordial interés que el laboratorio de química forense cuente con una metodología rápida eficiente y de fácil realización. Ya que es de gran importancia en la resolución de casos.

Clásicamente, en delitos sexuales la presencia de semen se ha considerado como una prueba de actividad sexual. Para confirmar la presencia de semen se realiza primero un análisis orientativo basándose en la actividad enzimática de la Fosfatasa ácida, después se efectúa la búsqueda de espermatozoides como una prueba confirmativa. Es necesario implementar una prueba más de rutina para reforzar el análisis en casos delictivos, incluso en individuos vasectomizados o azoospermicos para obtener resultados más confiables, por ello, es indispensable evaluar su especificidad y sensibilidad de la técnica inmunológica ABACar p30 para la determinación de la proteína p30 en semen.

2.0 RESUMEN

El análisis de la presencia de semen se basa en el estudio de algunos de sus constituyentes en la que desafortunadamente la sensibilidad de las técnicas para el análisis se limita dependiendo del origen y constituyentes de la muestra.

Para el estudio de la presencia de semen, consiste primero en un análisis de tipo orientativo que se fundamenta en la identificación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida en la cual se emplea una sal de diazonio para producir un intenso color púrpura. Posteriormente se confirma el análisis de semen con la búsqueda de espermatozoides. Recientemente se ha estudiado un antígeno designado como proteína p30 que parece ser el marcador ideal para identificación de semen, ya que es específico del sexo masculino, relativamente estable. Por ende es de gran utilidad la identificación de la proteína p30 al proporcionar una evidencia confiable en la identificación de semen en situaciones de no encontrar espermatozoides, como en hechos delictivos realizados por individuos vasectomizados o azoospermicos.

Con base a esto fue de interés realizar una evaluación en la efectividad y especificidad de la prueba inmunológica ABACard p30 para la identificación de antígeno específico de próstata.

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 ASPECTO LEGAL DE LA INTERVENCIÓN DEL PERITO QUÍMICO Y DEL DELITO SEXUAL

La intervención del perito químico esta sustentado en el:
CODIGO FEDERAL DE PROCEDIMIENTOS PENALES

Capitulo IV

Peritos

Artículo 220. Siempre que para el examen de personas, hechos u objetos se requieran conocimientos especiales, se procederá con intervención de peritos.

Artículo 220 bis. Cuando el inculpado pertenezca a un grupo étnico indígena, se procurará allegarse dictámenes periciales, a fin de que el juzgador ahonde en el conocimiento de su personalidad y capte su diferencia cultural respecto a la cultura media nacional.

En los procedimientos en los que intervengan personas que aleguen tener la calidad de indígenas, la misma se acreditará con la sola manifestación de quien la haga. Cuando el juez tenga duda de ella o fuere cuestionada en juicio, se solicitará a las autoridades comunitarias la expedición de la constancia que acredite la pertenencia del individuo a un determinado pueblo o comunidad.

Artículo 221. Los peritos que dictaminen serán dos o más pero bastara uno cuando solamente este pueda ser habido, o cuando el caso sea urgente.

Artículo 222. Con independencia de las diligencias de pericia desahogadas en la averiguación previa, la defensa y el ministerio público tendrán derecho a nombrar hasta dos peritos en el proceso, para dictaminar sobre cada punto que amerite intervención pericial, el tribunal hará saber a los peritos su nombramiento y les ministrará todos los datos que fueren necesarios para que emitan su opinión.

Artículo 223. Los peritos deberán tener titulo oficial en la ciencia o arte a que se refiere el punto sobre el cual deba dictaminarse. Si la profesión o arte están

legalmente reglamentadas; en caso contrario, se nombrarán peritos prácticos. Cuando el inculpado pertenezca a un grupo étnico indígena, podrán ser peritos prácticos, personas que pertenezcan a dicho grupo étnico indígena.

Artículo 224. También podrán ser nombrados peritos prácticos cuando no hubiere titulados en el lugar en que se siga la instrucción; pero, en este caso, se libraré exhorto o requisitoria al tribunal del lugar en que los haya, para que, en vista del dictamen de los prácticos, emitan su opinión.

Artículo 225. La designación de peritos hecha por el tribunal o por el ministerio público deberá recaer en las personas que desempeñen ese empleo por nombramiento oficial y a sueldo fijo, o bien en personas que presten sus servicios en dependencias del gobierno federal, en universidades del país, o que pertenezcan a asociaciones de profesionistas reconocidas en la república.

Artículo 226. Si no hubiere peritos de los que menciona el artículo anterior y el tribunal o el ministerio público lo estiman conveniente, podrán nombrar otros. En estos casos los honorarios se cubrirán según lo que se acostumbre pagar en los establecimientos particulares del ramo de que se trate a los empleados permanentes de los mismos, teniendo en cuenta el tiempo que los peritos debieron ocupar en el desempeño de su comisión.

Artículo 227. Los peritos que acepten el cargo, con excepción de los oficiales titulares, tienen obligación de protestar su fiel desempeño ante funcionario que practique las diligencias.

En casos urgentes, la protesta la rendirán al producir o ratificar su dictamen.

Artículo 228. El funcionario que practique las diligencias fijará a los peritos el tiempo en que deban cumplir su cometido. Si transcurrido ese tiempo no rinden su dictamen, o si legalmente citados y aceptado el cargo, no concurren a desempeñarlo, se hará uso de alguno de los medios de apremio.

Si a pesar de haber sido apremiado el perito no cumple con las obligaciones impuestas en el párrafo anterior, se hará su consignación al ministerio público para que proceda por el delito a que se refiere el artículo 178 del código penal.

Artículo 229. Cuando se trate de una lesión proveniente de delito y el lesionado se encontrare en algún hospital público, los médicos de éste se tendrán por nombrados como peritos, sin perjuicio de que el funcionario que practique las diligencias nombre, además, otros, si lo creyere conveniente, para que dictaminen y hagan la clasificación legal.

Artículo 230. La autopsia de los cadáveres de personas que hayan fallecido en un hospital público, la practicarán los médicos de éste, sin perjuicio de la facultad que conceda la parte final del artículo anterior.

Artículo 231. Fuera de los casos previstos en los dos artículos anteriores, el reconocimiento o la autopsia se practicarán por los peritos médicos legistas oficiales si los hubiere y, además, si se estima conveniente, por lo que designe el funcionario que conozca del asunto.

Artículo 232. Cuando el funcionario que practique las diligencias lo juzgue conveniente, asistirá al reconocimiento u operaciones que efectúen los peritos.

Artículo 233. El funcionario que practique las diligencias y las partes, podrán hacer a los peritos las preguntas que resulten pertinentes sobre la materia objeto de la pericia; les dará por escrito o de palabra, pero sin sugestión alguna, los datos que tuviere y hará constar estos hechos en el acta respectiva.

Artículo 234. Los peritos practicarán todas las operaciones y experimentos que su ciencia o arte les sugieran y expresarán los hechos y circunstancias que sirvan de fundamento a su opinión.

Artículo 235. Los peritos emitirán su dictamen por escrito y lo ratificarán en diligencia especial. Los peritos oficiales no necesitarán ratificar sus dictámenes, sino cuando el funcionario que practique las diligencias lo estime necesario. En esta diligencia el juez y las partes podrán formular preguntas a los peritos.

Artículo 236. Cuando las opiniones de los peritos discordaren, el funcionario que practique las diligencias los citará a junta en la que se discutirán los puntos de

diferencia, haciéndose constar en el acta el resultado de la discusión. Si los peritos no se pusieren de acuerdo, se nombrara un perito tercero en discordia.

Artículo 237. Cuando el peritaje recaiga sobre objetos que se consuman al ser analizados, no se permitirá que se verifique el primer análisis, sino cuando más, sobre la mitad de la sustancia, a no ser que su cantidad sea tan escasa que los peritos no puedan emitir su opinión sin consumirla por completo, lo cual se hará constar en el acta respectiva.

Artículo 238. Cuando el funcionario que practique las diligencias lo crea conveniente, podrá ordenar que asistan peritos a ellas.

Artículo 239. Cuando se niegue o ponga en duda la autoridad de un documento, podrá pedirse y decretarse el cotejo de letras o firmas, que se practicara conforme a las siguientes reglas:

- I. El cotejo se hará por peritos, pudiendo asistir a la diligencia respectiva el funcionario que esté practicando la averiguación, y, en ese caso, se levantará el acta correspondiente; y
- II. El cotejo se hará con documentos indubitables o con los que las partes de común acuerdo reconozcan como tales; con aquellos cuya letra o firma haya sido reconocida judicialmente, y con el escrito impugnado en la parte en que reconozca la letra como suya aquel a quien perjudique.

El juez podrá ordenar que se repita el cotejo por otros peritos.

CÓDIGO PENAL DEL ESTADO DE MÉXICO

SUBTÍTULO CUARTO

DELITOS CONTRA LA LIBERTAD SEXUAL

Capítulo I

Acoso sexual

Artículo 269. Al que con fines de lujuria asedie reiteradamente a persona de cualquier sexo que le sea subordinada, valiéndose de su posición derivada de sus relaciones laborales, docentes, domésticas o cualquier otra que implique jerarquía, se le impondrán de seis meses a dos años de prisión o de treinta a ciento veinte días de multa.

Capítulo II

Actos libidinosos

Artículo 270. Al que sin consentimiento de una persona púber ejecute en ella un acto erótico sexual, sin el propósito directo o inmediato de llegar a la cópula, se le impondrán de seis meses a dos años de prisión y de treinta a sesenta días multa. Si el ofendido es impúber, aun cuando otorgue su consentimiento, se impondrán de uno a cuatro años de prisión y de cuarenta a cien días multa.

Si se hiciera uso de la violencia física o moral se impondrá además la pena de uno a cuatro años de prisión.

(A) si los actos a que se refiere este artículo los cometiera un familiar consanguíneo directo y colateral hasta el cuarto grado, en agravio de persona impúber se impondrá de cuatro a diez años de prisión y de cien a quinientos días multa. (GEM 26/11/04)

Capítulo III

Estupro

Artículo 271. Al que tenga cópula con una mujer mayor de quince años y menor de dieciocho casta y honesta, obteniendo su consentimiento por medio de seducción, se le impondrán de seis meses a cuatro años de prisión y de treinta a cien días multa.

Artículo 272. No se procederá contra el inculpado del estupro, si no es por querrela de la mujer ofendida, de sus padres o, a falta de éstos, de sus representantes legítimos; pero cuando el inculpado se case con la mujer ofendida, se extinguirá la acción penal y la pena en el caso.

Capítulo IV

Violación

Artículo 273. Al que por medio de la violencia física o moral tenga cópula con una persona sin la voluntad de ésta, se le impondrán de diez a quince años de prisión, y de doscientos a dos mil días multa.

Comete también el delito de violación quien introduzca por vía vaginal o anal u oral cualquier parte del cuerpo, objeto o instrumento diferente al miembro viril por medio de la violencia física o moral, sea cual fuere el sexo del ofendido.

Para los efectos de este artículo, se entiende por cópula la introducción del miembro viril en el cuerpo de la víctima por vía vaginal, anal u oral, independiente del sexo, exista eyaculación o no.

Artículo 273 bis. Si la persona ofendida fuere menor de quince años, se impondrán de veinte a cuarenta y cinco años de prisión y de doscientos a dos mil días multa.

Se equipara a la violación la cópula o introducción por vía vaginal o anal cualquier parte del cuerpo, objeto o instrumento diferente al miembro viril, con persona privada de razón, de sentido o cuando por enfermedad o cualquier otra causa no pudiese resistir o cuando la víctima fuera menor de quince años.

Artículo 274. Son circunstancias que agravan el delito de violación las siguientes:

- I. Cuando en la comisión del delito de violación intervengan dos o más personas se impondrán, además de las penas señaladas en los artículos 273 y 273bis, de treinta y cinco a setenta años de prisión y de cien a quinientos días multa.
- II. Si el delito fuere cometido por un ascendiente contra su descendiente, por éste contra aquel, por un hermano contra otro, por el tutor en contra de su pupilo o por el padrastro, madrastra, concubina, concubinario, amasio o amasia en contra del hijastro o hijastra, además de las sanciones provistas en los artículos 273 y 273 bis se impondrán de tres a nueve años de prisión y de treinta a setenta y cinco días multa así como la pérdida de la patria potestad o la tutela en aquellos casos en que la ejerciere sobre la víctima.
- III. Cuando el delito de violación sea cometido por quien desempeñe un empleo, cargo o comisión públicos o ejerza una profesión, utilizando los medios o circunstancias que ellos le proporcionen será destituido definitivamente del cargo o empleo o suspendido hasta por el término de diez años en el ejercicio de su profesión, independientemente de las sanciones a que se haga acreedor; y
- IV. Cuando por delito de violación se causare la muerte, se impondrán de cuarenta a setenta años de prisión y de setecientos a cinco mil días multa.

3.2 APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

3.2.1 Escroto

El escroto es una prolongación cutánea del abdomen con forma de bolsa, que está formada por piel laxa y una fascia superficial. Es la estructura de soporte para los testículos. En su porción externa, parece una simple bolsa de piel separada en partes laterales por medio de un reborde que se denomina como rafe (costura). En su porción interna, se divide en dos sacos por medio de un tabique. Cada uno contiene solo un testículo. El tabique está formado de una fascia superficial y de tejido contráctil que se conoce como dartos, que está formado de haces de fibras de músculo liso. El dartos también se encuentra en el tejido subcutáneo del escroto y se continúa en forma directa con el tejido subcutáneo de la pared abdominal. El dartos provoca el arrugamiento de la piel del escroto.

La localización del escroto y la contracción de sus fibras musculares regulan la temperatura de los testículos. La producción y supervivencia de los espermatozoides requiere una temperatura menor a la temperatura corporal normal. Como el escroto esta fuera de las cavidades corporales, proporciona un ambiente con una temperatura de tres grados centígrados por debajo de la temperatura corporal normal. El músculo cremáster (kremaster = suspender), una pequeña banda de músculo estriado, eleva los testículos durante la erección y durante la exposición al frío, acercándolos a la cavidad pélvica, donde pueden absorber calor corporal. La exposición a un ambiente más cálido, invierte el proceso. El dartos también está controlado en forma refleja para asegurar que la temperatura del testículo se mantenga tres grados centígrados por debajo de la temperatura corporal normal.

3.2.2 Testículo

Los testículos son glándulas ovales pares que miden cerca de cinco centímetros de longitud y 2.5 centímetros de diámetro. Cada testículo pesa entre 10 y 15 gramos. Se desarrollan en la parte alta de la pared abdominal posterior del abdomen y por lo general comienzan su descenso hacia el escroto a través del canal inguinal durante la segunda mitad del séptimo mes del desarrollo fetal.

Los testículos están cubiertos por una membrana serosa que se conoce como túnica vaginal, una prolongación del peritoneo en forma de saco que se forma durante el descenso de los testículos. En la parte interna de la túnica vaginal se

encuentra una capa blanca de tejido fibroso denso, que reconoce como túnica albugínea y que se extiende hacia adentro dividiendo cada testículo en una serie de compartimientos internos que se denominan lóbulos. Cada uno de los 200 a 300 lóbulos contiene de uno a tres conductos enrollados, que producen espermatozoides por medio de la espermatogénesis y que se llaman túbulos seminíferos. Este proceso se abordará en breve.

Un corte transversal a través de un túbulo seminífero, revela que está cubierto con células espermatogénicas en diversas etapas de desarrollo. Las células espermatogénicas presentan etapas sucesivas en un proceso continuo de diferenciación de las células germinales masculinas. Las células espermatogénicas más inmaduras, las espermatogonias, se localizan en la membrana basal y se dirigen hacia la luz del túbulo. Se pueden observar capas de células que van madurando en forma progresiva. En orden de madurez, estas células se llaman espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios y espermátides. En ese momento, el espermatozoide casi ha alcanzado su madurez, que alcanza en la luz del túbulo, donde empieza a moverse a través de una serie de conductos. Las células sus tentaculares o de sertoli, se encuentran incluidas entre los espermatozoides en desarrollo dentro de los túbulos. En la parte interna de la membrana basal, las células sus tentaculares se unen por medio de puntos de unión para formar la barrera hematotesticular. Esta barrera es importante debido a que los espermatozoides y las células en desarrollo producen antígenos de superficie que el sistema inmune reconoce como cuerpo extraño. La barrera previene la respuesta inmune contra los antígenos, aislando las células para evitar el contacto con la sangre. Dicha respuesta inmune se observa después de la vasectomía, en donde los anticuerpos antiespermatozoides específicos, que se producen en las células del sistema inmune, se ponen en contacto con los espermatozoides que ya no se encuentran aislados dentro del conducto reproductor. Las células sus tentaculares apoyan y protegen a las células espermatogénicas en desarrollo; a los espermatoцитos en crecimiento, a las espermátides y a los espermatozoides; además fagocitan a las células espermatogénicas degeneradas; controlan los movimientos de las células espermatogénicas y la liberación de espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos y secretan la hormona inhibina que ayuda a regular la producción de espermatozoides y de proteína fijadora de andrógenos,

una sustancia que se requiere para la producción de espermatozoides y que concentra la testosterona en el túbulo seminífero. Entre los túbulos seminíferos se encuentran racimos de endocrinocitos intersticiales o de Leydig. Estas células secretan la hormona masculina testosterona, el andrógeno más importante.

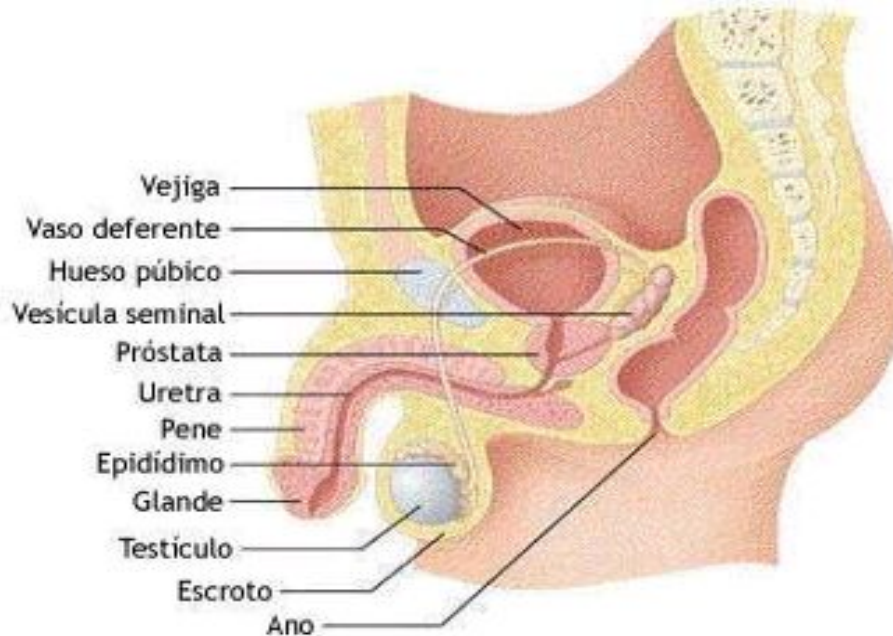


Figura 1. Aparato reproductor masculino

3.2.3 Conducto de los testículos

Después de su reproducción, los espermatozoides se mueven a través de los túbulos seminíferos hasta los túbulos rectos. Los túbulos rectos llegan a una red de conductos en el testículo que se llaman la rete testis. Algunas células que recubren a la rete testis poseen cilios que con probabilidad ayudan a mover los espermatozoides a lo largo de su luz. Posteriormente, los espermatozoides se expulsan afuera de los testículos.

3.2.4 Epidídimo

Los espermatozoides se transportan fuera del testículo a través de una serie de conductos eferentes enrollados que se encuentra en el epidídimo y que llegan a un solo tubo que se llama conducto del epidídimo. Existen cambios morfológicos que se presentan en los espermatozoides durante su paso por el epidídimo.

El epidídimo (epi = arriba; didymos = testículo) es un órgano en forma de coma que se encuentra en el borde posterior del testículo y está formado en su mayor parte por tubos ligeramente enrollados que se conocen con el nombre de

conductos del epidídimo. La porción superior y más grande del epidídimo se conoce como cabeza. En la cabeza, los conductos eferentes se unen con los conductos del epidídimo. El cuerpo es la porción media y más delgada del epidídimo, la cola es la porción inferior más pequeña. En su extremo distal, la cola del epidídimo continúa con los conductos deferentes.

Los conductos del epidídimo son estructuras ligeramente enrolladas que pueden medir desenrollados cerca de seis metros de longitud u un milímetro de diámetro. El epidídimo mide cerca de 3.8 centímetros. Los conductos del epidídimo están revestidos con epitelio cilíndrico pseudoestratificado y recubiertos por capa de músculo liso. Las superficies libres de las células cilíndricas contienen microvellosidades y ramificaciones que se llaman estereocilios.

Desde el punto de vista funcional, los conductos del epidídimo son el sitio de maduración de los espermatozoides. Los espermatozoides requieren entre 10 y 14 días para terminar su maduración, esto es, para ser capaces de fertilizar un óvulo. Los conductos del epidídimo también almacenan espermatozoides y los expulsan hacia la uretra durante la eyaculación mediante contracciones peristálticas de su músculo liso. Los espermatozoides pueden permanecer almacenados en los conductos del epidídimo por más de cuatro semanas. Después de ese tiempo, se expulsan fuera del epidídimo o se reabsorben.

3.2.5 Conductos deferentes

Formado por la reunión en ángulo agudo de la vesícula seminal con el deferente, se dirige oblicuamente hacia abajo, adelante y medialmente, en el espesor de la próstata. Después de un trayecto de 15 a 20 mm en el adulto, desemboca en la pared posterior de la uretra prostática a la derecha y a la izquierda del utrículo prostático y la pared uretral en la cual descargan los conductillos prostáticos. En la próstata, los dos conductos eyaculadores están situados en un espacio común en contacto el uno con el otro, separados adelante para dar paso al utrículo prostático que los separa. El conducto está constituido por una pared muscular lisa, tapizada por una mucosa. Toma sus vasos y sus nervios de las redes prostáticas.

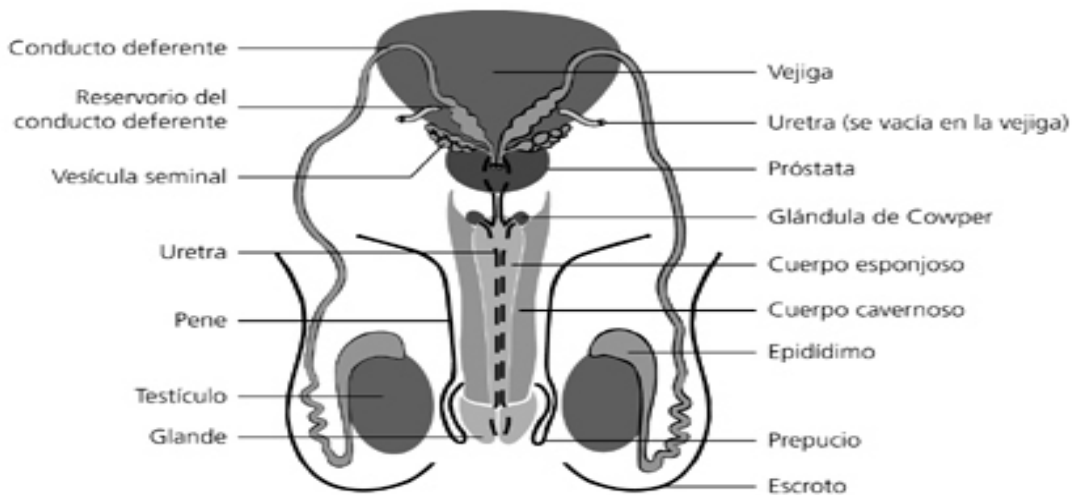


Fig. 2. Forma en que se encuentran distribuidos los conductos

Glándulas accesorias

Las tres glándulas accesorias del aparato reproductor masculino que proveen los componentes líquidos del semen, son las dos vesículas seminales, un par de pequeñas glándulas bulbouretrales que vacían sus secreciones viscosas en la uretra cavernosa (esponjosa) y la glándula prostática.

Cada vesícula seminal es una larga glándula estrecha muy replegada sobre sí misma. Produce una espesa sustancia nutritiva de color amarillo característico. La glándula prostática se compone de numerosas glándulas individuales que rodean la pared de la uretra cuyos conductos la perforan. Estas glándulas se distribuyen en tres regiones de la próstata por lo que se denominan glándulas prostáticas mucosas, submucosas y externa (principal). La secreción de la glándula prostática es un líquido fino blanquecino que contiene enzimas proteolíticas y fosfatasa ácida.

3.2.6 Vesículas seminales

Son dos pequeños reservorios bilaterales situados detrás de la vejiga y adelante del recto. Cada una de ellas está dirigida de atrás hacia adelante, de lateral hacia medial y de arriba hacia abajo.

Las vesículas seminales son dos saculaciones que producen gran parte del semen. Cada vesícula mide unos 5 cm de largo pero puede ser más corta. El extremo ancho se dirige hacia afuera, hacia arriba y hacia atrás. Su extremo estrecho casi se acerca al de la vesícula contra lateral. Las vesículas seminales se palpan por el recto cuando la vejiga urinaria está llena. Cuando las vesículas

seminales están llenas, son muy sensibles a la presión. Estas estructuras sólo son glándulas secretorias, no zonas de almacenamiento de esperma.

Las vesículas seminales están revestidas de epitelio secretor que produce un material mucoide rico en celulosa y pequeñas cantidades de ácido ascórbico, inositol, ergotioneína, cinco aminoácidos, fosforilcolina, prostaglandina y fibrinógeno. Durante la eyaculación cada vesícula seminal vacía su contenido en el conducto eyaculador al unísono que el conducto deferente vacía el semen. Esto aumenta considerablemente el volumen de semen eyaculado, la celulosa y otras sustancias contenidas en el líquido seminal tienen gran valor nutritivo y protector para los espermatozoides hasta que uno de ellos fertiliza el óvulo. Se cree que las prostaglandinas contribuyen a la fertilización de dos formas:

*Reaccionan con el moco cervical para hacerlo más receptivo al espermatozoide.

*Causan quizá contracciones peristálticas inversas en el útero y las trompas de Falopio para desplazar los espermatozoides hacia los ovarios (unos cuantos alcanzan el extremo superior de las trompas de Falopio en espacio de cinco minutos).

3.2.7 Glándulas bulbo uretrales (Glándulas de Mery Cowper)

Las glándulas de Cowper (bulbo uretrales) son dos estructuras redondeadas de 0.5 a 1.5 cm de diámetro. Están incluidas en la estructura del esfínter de la uretra, por detrás de su porción membranosa. Secretan una sustancia como moco cuya función no está bien determinada, se cree que este líquido claro y viscoso, se vierte en la uretra posterior en el acto de la eyaculación. Este líquido favorece la aglutinación del esperma y su pasaje por la uretra.

Los conductos de las glándulas de Cowper pasan por la membrana perineal, penetran en el bulbo del pene y atraviesan su estructura. Después de un trayecto de 2.5 a 4 cm, terminan abriéndose en la cara inferior de la porción esponjosa de la uretra. Cada una de ellas tiene el volumen de un carozo de cereza con un conducto excretor dirigido hacia abajo, adelante y medialmente; los dos conductos desembocan muy cerca uno de otro en la uretra.

3.2.8 Próstata

Es la glándula desarrollada alrededor de la parte inicial de la uretra. Forma parte del aparato genital, si bien su posición y relaciones la unen a la vejiga y a la uretra, órganos urinarios.

La próstata secreta un líquido alcalino claro de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida, una enzima coagulante y una profibrinolisisina. Durante la eyaculación la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con las contracciones del conducto deferente y vesículas seminales, de manera que el líquido fluido y lechoso de la glándula prostática se une a la masa del semen. La característica alcalina esencial del líquido prostático puede ser muy importante para una buena fertilización del huevo, pues el líquido del conducto deferente es relativamente ácido debido a la presencia de productos terminales del metabolismo de los espermatozoos, y, en consecuencia; inhibe la fertilidad de los mismos. También las secreciones vaginales son de tipo muy ácido (pH de 3.5 a 4.0). El espermatozoos no logra su mejor motilidad hasta que el pH de los líquidos vecinos se eleva hasta aproximadamente 6 a 6.5. En consecuencia, es probable que el líquido prostático neutralice la acidez de los demás líquidos después de la eyaculación, y aumente considerablemente la motilidad y fertilidad de los espermatozoos.

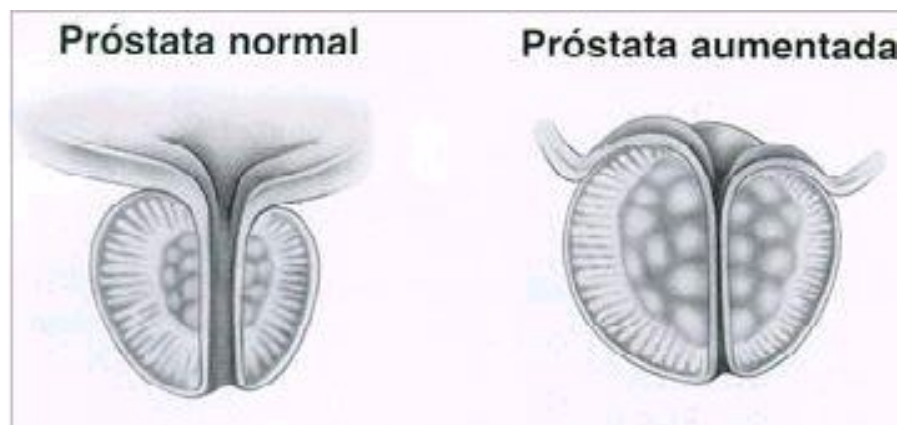


Figura 3. Glándula prostática

3.3 Semen

El líquido que se eyacula al momento del orgasmo, el semen, contiene espermatozoides y las secreciones de las vesículas seminales, próstata glándulas de Cowper y, quizá, las glándulas uretrales. Se eyacula un volumen promedio de 2.5 a 3.5 mL después de varios días de continencia. El volumen de semen y la cuenta espermática disminuyen rápidamente con la eyaculación repetida. Aunque sólo se requiere un espermatozoide para fecundar al óvulo, lo normal es que existan alrededor de 100 millones de espermatozoides por mililitro de semen; 50% de los varones con cuentas de 20 a 40 millones por mililitro y todos aquéllos con cuentas inferiores a 20 millones/mL son estériles. La presencia de muchos espermatozoides con anomalías morfológicas o inmóviles también se relaciona con la infertilidad. Existe una alta concentración de prostaglandinas en el semen. Que en realidad provienen de las vesículas seminales, pero se desconoce la función de estos derivados de ácidos grasos en el semen.

Los espermatozoides humanos se mueven a una velocidad cercana a 3 mm/min por el tracto genital femenino. Llegan a las trompas de Falopio de 30 a 60 min después de la cópula.

Tabla 2. Composición del semen humano

Color	Blanco, opalescente	
Densidad específica	1.028	
PH	7.35 a 7.50	
Cuenta espermática normal	En promedio cerca de 100 millones/mL con menos 20% de formas anormales.	
Otros componentes	Fructosa (1.5 a 6.5 mg/mL) Fosforilcolina Ergotioneína Ácido ascórbico Flavinas Prostaglandinas Espermina Ácido cítrico Colesterol fosfolípidos Fibrinolisisina, fibrinogenasa Cinc Fosfatasa ácida Fosfato Bicarbonato Hialuronidasa	De las vesículas seminales (aportan 60% del volumen total) De la próstata (aportan 20% del volumen total) Amortiguadores

ión	(mmol/L)
Cloruro	43
Carbonato	22-26
Sodio	121
Potasio	23
Calcio	7
Magnesio	3.6
zinc	2.1

Tabla 3. Componentes iónicos

Una particularidad del semen es su elevada concentración en Zn de origen prostático: de 100 a 350 mg/L, con un valor medio de 140 mg/L.

La fosfatasa ácida está presente en cantidades apreciables en el líquido seminal y ha resultado útil desde el punto de vista forense en el diagnóstico de la violación, porque la actividad de fosfatasa ácida vaginal es baja (<10 U/l), mientras que, después del coito, alcanza valores mayores de 50U/l.

El semen es un líquido muy viscoso opalescente, de color blanco grisáceo, con una densidad de 1.028. Su pH varía en re 7.35 7.8 a un cuando pueden encontrarse, especímenes con pH superior a 8, sus amortiguadores, fosfato y bicarbonato, contribuyen a proteger los espermatozoides contra el pH vaginal. Se coagula poco después de ser expelido, pero se licua en unos minutos, alcanzando entonces las células espermáticas su máxima movilidad. El sustrato para la coagulación está constituido por material proteínico secretado por las vesículas seminales; en tanto que las enzimas licuantes (fibrinolisisina y fibrinogenasa), sólo hacen contacto con el sustrato durante la eyaculación, pues son elaboradas en un lugar distante de las vesículas seminales y la próstata.

Contiene hormonas, fructuosa, fosfatasas ácida y alcalina, espermita, colina, ergotioneína ácido cítrico, lípidos, proteínas, hialuronidasa, prostaglandina, ribosa, inositol, sorbitol, flavinas, aminas, albúmina, alfa y beta globulinas así como una gamma globulina, lecitina, ácidos grasos, fosforilcolina, zinc, calcio y antígeno soluble de grupo sanguíneo.

Como elemento celular característico del semen se encuentran los espermatozoides; sin embargo el cuadro celular es mucho más complejo: presenta células gigantes, células epiteliales, leucocitos, células prostáticas, cilindros testiculares y bacterias.

3.4 Erección, emisión y eyaculación

La erección que se acompaña de aumentos de la longitud y grosor del pene, se logra como resultado del flujo de sangre a los «tejidos eréctiles» del pene. Estos tejidos eréctiles comprenden dos estructuras pares, los *cuerpos cavernosos*, localizados en la parte dorsal del pene, y un *cuerpo esponjoso* impar situado en la parte ventral. La uretra discurre por el centro del cuerpo esponjoso. El tejido eréctil forma columnas que se extienden por toda la longitud del pene, aunque los cuerpos cavernosos no llegan hasta la punta.

La erección se logra por una vasodilatación de las arteriolas inducida por nervios parasimpáticos, que permite que la sangre fluya a los cuerpos cavernosos del pene. Actualmente se cree que el neurotransmisor que intermedia este aumento del flujo sanguíneo es el óxido nítrico: Cuando el tejido eréctil se llena de sangre y el pene se vuelve turgente, la salida del flujo venoso se ocluye de forma parcial, ayudando así a la erección. El término emisión alude al movimiento del semen a la uretra, y la eyaculación describe la expulsión forzosa del semen fuera del pene. La emisión y la eyaculación se estimulan por los nervios simpáticos, que producen contracciones peristálticas del sistema tubular, contracciones de las vesículas seminales y de la próstata, y contracciones de los músculos de la base del pene. La función sexual del varón requiere, por lo tanto, la acción sinérgica (y no antagónica) de los sistemas parasimpático y simpático.

La erección está controlada por dos porciones del sistema nervioso central el hipotálamo en el cerebro y la porción sacra de la médula espinal. Los pensamientos sexuales conscientes originados en la corteza cerebral actúan a través del hipotálamo controlando la región sacra, que, a su vez, aumenta la actividad nerviosa parasimpática para promover la vasodilatación y la erección del pene. Sin embargo, para que se produzca la erección no son necesarios pensamientos conscientes, debido a que la estimulación sensitiva del pene puede activar más directamente la región sacra de la médula espinal y producir una erección.

3.5 Antígeno específico prostático (PSA)

El PSA fue descrito en 1979 a partir de homogeneizados de tejidos prostáticos y vesículas seminales, detectándose, un año después, en el suero de pacientes con cáncer de próstata avanzado. Se trata de una glucoproteína de 33-34000 Daltons. Compuesta por única cadena de 237 aminoácidos, coincidiendo en un 78% con la calicreína glandular humana. En un 58% con la proteína fijadora del factor de crecimiento epidérmico y en menor porcentaje con otras proteasas séricas, lo cual sugiere un origen común, y con un 7% de hidratos de carbono. Sólo se produce en el citoplasma de las células epiteliales de los conductos y alvéolos de la próstata y sus cantidades se expresan en milésimas de miligramo o nanogramo. Posee actividad proteolítica semejante a la tripsina y quimiotripsina y su sustrato fisiológico es una proteína del coágulo seminal, antígeno específico de la vesícula seminal, que produce la licuefacción del semen, para fluidificarlo y aumentar su movilidad de los espermatozoides.

En los hombres normales, solo unas cantidades mínimas de PSA circulan en suero. Se dan concentraciones elevadas de PSA en asociación tanto con el cáncer localizado como con el avanzado. En la mayoría de los laboratorios una concentración sérica de 4 ng/mL se considera como un valor límite entre la normalidad y la anormalidad. Otros factores, como la hiperplasia prostática benigna, prostatitis, infarto, instrumentación de la próstata y eyaculación aumentan también las concentraciones del PSA en el suero.

En contra de lo que hasta ahora se creía no se sintetiza exclusivamente por el epitelio prostático sino que es posible observarlo en otras localizaciones, como la glándula mamaria normal en lactancia, leche materna, glándulas salivales, sudoríparas y en fluidos vaginales.

Es un marcador de tejido prostático, no de tumor de esa localización, por lo cual pueden verse incrementos séricos en ausencia de malignidad.

El PSA se localiza en el suero en tres formas, libre o formando complejos con la α_2 macroglobulina y la α_1 antiqumiotripsina. Estos últimos son estables, producen la inactivación de la enzima, tienen un peso molecular de 90000 Da y

constituyen la forma predominante en el suero. Los complejos PSA- α 2 macroglobulina son irreversibles y no pueden detectarse con los métodos analíticos de rutina, mientras que el PSA libre con peso molecular de 30000 Da, constituye el 5-30% de todo el PSA.

4.0 TÉCNICAS DE ORIENTACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SEMEN

4.1 Fluorescencia a la luz ultravioleta

El líquido espermático, contiene flavinas en alta concentración y son las responsables de impartir fluorescencia blanco verdosa al semen cuando las manchas de éste son observadas a la luz ultravioleta; por lo tanto este procedimiento es de gran utilidad para la localización topográfica de posibles huellas espermáticas, tanto en el lugar de los hechos como en prendas de vestir.

Se usa la luz de Wood o la de Gallois con filtro de cuarzo con óxido de níquel y longitud de onda alrededor de 3,650 Å (380 – 470 nm) y la mancha, en cuarto oscuro, toma una fluorescencia blanco-verdosa sin poder evitar las dudas sobre pus, orina y mucus.

4.2 Técnica de la fosfatasa ácida

La fosfatasa ácida está presente en los géneros animal y vegetal; siendo una enzima, tiene la propiedad de hidrolizar los ésteres alifáticos y aromáticos del ácido ortofosfórico.

Por lo que se refiere a los fluidos corporales humanos, se ha demostrado que en el líquido seminal se encuentra en concentraciones de 20 a 400 veces más que en los otros fluidos; por lo tanto, la presencia de semen en manchas sospechosas se puede detectar por el hallazgo de elevadas cantidades de fosfatasa ácida.

Su detección se basa en una reacción cromática de la enzima fosfatasa ácida, muy abundante en la secreción genital masculina.

La fosfatasa ácida del espermatozoide reacciona con el reactivo alfa naftil fosfato de sodio y queda libre alfa naftol; este reacciona con orto dianisidina tetrazotizada y forma un colorante azoico violeta intenso.

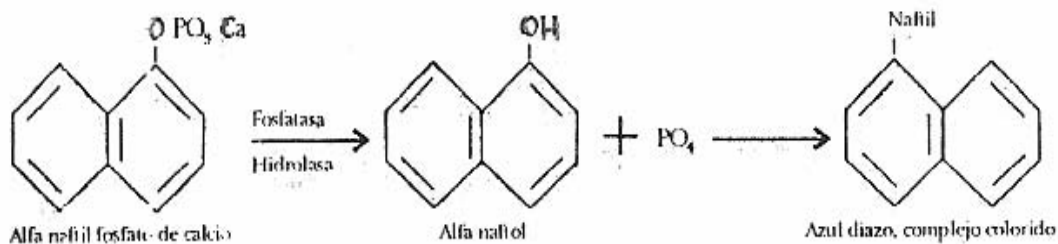


Figura 4. Reacción química en la determinación de la fosfatasa ácida.

No obstante que está aceptado que sólo en el líquido seminal existen altas concentraciones de fosfatasa ácida, es importante señalar que una prueba positiva no es concluyente para afirmar que una mancha es de semen, ya que puede encontrarse en otros tejidos y plantas.

Kina, Hauck y Leithoff han apuntado la siguiente lista de productos y especímenes que también la contienen:

Bacterias	Glóbulos rojos	Veneno de víbora
Leche humana	Cereal de arroz	Almendras dulces
Hígado humano	Coliflor	Coles de Bruselas
Orina humana	Trébol	Caracoles
Riñón humano	Semillas de alfalfa	Moho de hongos
Exudado vaginal		

Tabla 4. Especímenes y productos que presentan reacción con el activo de fosfatasa ácida.

De la observación de la lista anterior, se infiere el por qué la técnica de detección de fosfatasa ácida está catalogada como una reacción de orientación y por lo tanto la presencia de semen deberá confirmarse con el hallazgo de los espermatozoides.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución 1

Orto dianisidina tetrazotizada 1 gramo

Acetato de sodio 20 gramos

Ácido acético 10 mL

Agua destilada 100 mL

Solución 2

Alfa naftil fosfato de sodio 0.8 gramos

Agua destilada 10 mL

PREPARACIÓN DEL REACTIVO FINAL

En un matras volumétrico de 100 mL, agregar 10 mL de la solución 1 y 1 mL de la solución 2, proceder aforar con agua destilada, guardar la solución en un frasco ámbar y en refrigeración.

PROCEDIMIENTO

La mancha problema o el hisopo con el cual se tomó la muestra, se colocan entre dos hojas de pape filtro; lo mismo se hace con material igual no manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como testigo positivo. Se colocan sobre una lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: testigo negativo, muestra problema y testigo positivo; inmediatamente después se agregan aproximadamente 5 gotas de reactivo a cada una de las muestras, con una pipeta Parteur.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La aparición de una coloración violeta intensa 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.K.A y por lo tanto la muy probable presencia de semen; en el testigo positivo siempre deberá observarse la intensidad de color violeta intensa, tonalidad que no deberá aparecer en el testigo negativo.

Solución 2

Alfa naftil fosfato de sodio 0.8 gramos

Agua destilada 10 mL

PREPARACIÓN DEL REACTIVO FINAL

En un matras volumétrico de 100 mL, agregar 10 mL de la solución 1 y 1 mL de la solución 2, proceder aforar con agua destilada, guardar la solución en un frasco ámbar y en refrigeración.

PROCEDIMIENTO

La mancha problema o el hisopo con el cual se tomó la muestra, se colocan entre dos hojas de pape filtro; lo mismo se hace con material igual no manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como testigo positivo. Se colocan sobre una lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: testigo negativo, muestra problema y testigo positivo; inmediatamente después se agregan aproximadamente 5 gotas de reactivo a cada una de las muestras, con una pipeta Parteur.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La aparición de una coloración violeta intensa 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.K.A y por lo tanto la muy probable presencia de semen; en el testigo positivo siempre deberá observarse la intensidad de color violeta intensa, tonalidad que no deberá aparecer en el testigo negativo.

5.0 TÉCNICAS CONFIRMATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SEMEN

La certeza de que una muestra corresponde a semen, se da sin lugar a duda con el hallazgo de los espermatozoides en el espécimen analizado. A continuación se describen técnicas de tinción para su mejor visualización al microscopio.

5.1 Tinción de Gram

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. colorante de cristal violeta

Solución A

Cristal violeta 2 gramos

Alcohol etílico absoluto 20 mL

Solución B

Oxalato de amonio 0.8 gramos

Agua destilada 80 mL

Mezclar las soluciones A y B. Envasar en frasco gotero color ámbar.

2. solución yodo iodurada (lugol)

Yodo metálico 1 gramo

Ioduro de potasio 2 gramos

Agua destilada 300 mL

Diluir 1:15 en agua destilada antes de usarla.

3. decolorante

Alcohol etílico absoluto (95%)

4. colorante de safranina

Safranina (2.5 % en alcohol etílico) 10 mL

Agua destilada 100 mL

PROCEDIMIENTO

El frotis o una gota de suspensión problema, se secan ligeramente al calor del mechero o bien se fijan con metanol.

- Añadir el reactivo de cristal violeta hasta cubrir la muestra y dejarlo actuar por 1 minuto.
- Lavar con agua destilada.

- Cubrir nuevamente el portaobjetos con la solución 2 durante 1 minuto, tirar el exceso de lugol y decolorar con agitación utilizando el reactivo número 3 durante 30 minutos.
- Dejar secar y cubrir la preparación con el reactivo asignado con el número 4, dejarlo actuar de 10 a 30 segundos.
- Lavar con agua destilada y observar al microscopio con aceite de inmersión y el objetivo correspondiente.

INTERPRETACIÓN

La cabeza se tiñe de color rosa y el cuerpo medio y el tallo se observan de color azul.

5.2 Técnica con azul de metileno

Colorante de azul de metileno:

Azul de metileno 1 gramo

Alcohol etílico absoluto (95 %) 30 mL

Agua destilada 100 mL

Acético glacial 5 mL

Disolver el azul de metileno en el etanol, añadir el ácido acético y el agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Fijar el frotis que contiene la muestra problema con calor.

- Cubrir la preparación con el colorante de azul de metileno.
- Dejarlo actuar durante un minuto.
- Retirar el colorante y lavar con agua.
- Observar al microscopio con aceite de inmersión, e igual objetivo.

INTERPRETACIÓN

Los espermatozoides se observarán coloreados tanto la cabeza como cuerpo y cola de color azul.

5.3 Técnica de Christmas Tree

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

1. Colorante rojo rápido nuclear:

Rojo rápido nuclear 50 mg

Sulfato de aluminio 2.5 gramos

Agua destilada 100 mL

Calentar a ebullición los 100 mL de agua destilada y disolver el sulfato de aluminio, adicionar el colorante rojo rápido nuclear, agitar hasta disolución completa.

Enfriar y filtrar en papel Wathman No. 1, almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 a 8 °C.

2. Colorante de índigo carmín:

Ácido pícrico 1.3 gr

Índigo carmín 0.23 gr

Agua destilada 100 mL

Disolver al ácido pícrico en los 100 mL, de agua; añadir los 0.23 gramos de índigo carmín; mezclar perfectamente con agitador mecánico. Guardar en frasco gotero ámbar.

PROCEDIMIENTO

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).

Lavar con agua desionizada, durante 5 segundos, añadir una gota de el colorante número 2 y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos. Lavar con etanol absoluto para decolorar, secar por 5 minutos.

INTERPRETACIÓN

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

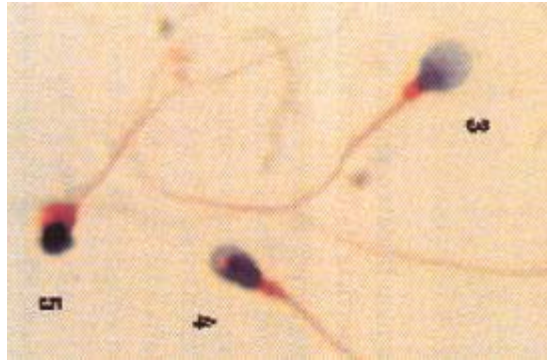


Figura 7. Tinción de Christmas Tree

5.4 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS USADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO ESPECÍFICO PROSTÁTICO (PSA).

5.4.1 Inmunoelectroforesis

Este método combina los principios de la electroforesis de zona con reacciones antígeno-anticuerpo en geles.

La inmunoelectroforesis es un procedimiento en dos etapas: en la primera, la mezcla de proteínas (antígeno) es separada por electroforesis de zona, y en la segunda, los grupos de proteínas separados por su movilidad electroforética son analizados con anticuerpos específicos para permitir el desarrollo de arcos de precipitación.

NATURALEZA DE LOS MEDIOS DE SOPORTE

Se dispone de dos tipos de tales soportes, uno en el que las moléculas son separadas principalmente en base a su carga (papel, acetato de celulosa, almidón, pevicón), y el otro donde el tamaño del poro del soporte disminuye la movilidad electroforética de las proteínas de acuerdo a su tamaño (geles preparados con almidón, agar, agarosa, acrilamida, y otras sustancias poliméricas).

Prácticamente cualquier medio de soporte usado en electroforesis de zona se puede adaptar el empleo posterior en análisis inmunológico. No obstante, el más ampliamente utilizado es el gel de agar. Estos geles se disuelven con facilidad en soluciones calientes de buffer, son sólidos a temperatura ambiente, aun en bajas concentraciones de agar son elásticos y homogéneos, su tamaño de poro es

relativamente grande como para que tenga lugar la difusión y poseen suficiente transparencia como para posibilitar la observación de las reacciones inmunológicas.

Tras la electroforesis, se lleva a cabo la identificación de los componentes separados, en el mismo gel. Con este propósito, se corta una franja larga y estrecha de agar, paralela y la dirección de la separación electroforética, y a una distancia conveniente del punto de siembra. El canalículo resultante se llena con solución de anticuerpo. Como en todo tipo de reacción inmunológica en geles, los antígenos y anticuerpos difunden unos hacia los otros. Debido a las diferencias en los patrones de difusión (los anticuerpos difunden como un frente lineal desde el canal, mientras que los antígenos lo hacen en forma radial partiendo de focos separados electroforéticamente). Las líneas de precipitación aparecen como arcos elipsoides. Dado que la mezcla de antígenos se aplica en una concavidad de agar, tras la separación electroforética cada foco de antígeno conserva la forma de la concavidad de siembra y luego difunde radialmente. Como resultado, la posición de la zona de equivalencia, donde la precipitación es visible, depende de la concentración de antígeno y de anticuerpo. Cuando la de antígeno es demasiado elevada, la precipitación puede producirse en el canal del anticuerpo, y sólo los extremos del arco, donde la concentración de antígeno es muy baja, son visibles. Cuando la concentración del antígeno es muy baja, no se visualiza la precipitación. La posición del arco de precipitado con respecto a la franja de anticuerpo puede indicarla concentración del antígeno, si las características y la potencia del antisuero son conocidos.

La técnica de inmunolectroforesis, se puede describir en tres etapas principales en el análisis de proteínas (1) la muestra se coloca en una pequeña concavidad de la placa de agar y se realiza la electroforesis para separar los principales componentes a analizar, (2) se corta el agar formando un canal que se llena con el anticuerpo, los componentes de la muestra (antígenos) en el agar central y los anticuerpos del canal difunden a través del agar unos hacia otros. (3) los arcos de precipitación se visualizan donde los complejos antígeno-anticuerpo indican la presencia de proteínas (antígenos) individuales.

El número mínimo de componentes proteicos reconocibles en una mezcla, está representado por el número de arcos y esto depende de la presencia de anticuerpos adecuados. Hay muy poca probabilidad de que dos proteínas simultáneamente posean la misma movilidad electroforética, posean las mismas dimensiones moleculares que gobiernen la difusión y estén sujetos a idénticas concentraciones respectivas de anticuerpo como para producir zonas de equivalencia superpuestas, con una única línea de precipitación. Todo análisis inmunolectroforético depende primariamente de que haya anticuerpos apropiados en concentración correcta.

En el análisis inmunolectroforético, tanto la especificidad como la fuente del anticuerpo requieren consideración. Los anticuerpos equinos producen complejos solubles en presencia de exceso de antígeno. Es una buena práctica ha ensayar cada partida nueva de anticuerpos en varias diluciones con diversas concentraciones de antígenos para determinar las concentraciones operativas óptimas de los reactantes.

En general, son dos los tipos de antisueros que se utilizan; monoespecifico, que contenga anticuerpos hacia una proteína, una determinante antigénico o una porción de molécula (ejemplo: la porción Fc de las gammaglobulinas), o polivalente, que contenga una mezcla de anticuerpos hacia antígenos múltiples (ejemplo: antisuero humano total, suero antiinmunoglobulina).

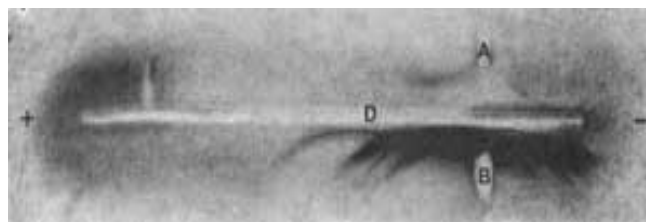


Figura 8. Arcos de precipitación en película de agar

Cuando se utiliza el análisis inmunolectroforético para evaluar la purificación de un antígeno, los anticuerpos empleados deben prepararse contra todos los antígenos de la mezcla inicial y reaccionar con todos ellos. Esto debe seguirse con anticuerpos preparados contra fracciones parcialmente purificadas, teniendo en cuenta el hecho de que este método ha de detectar sólo los componentes contra los cuales se formo el anticuerpo.

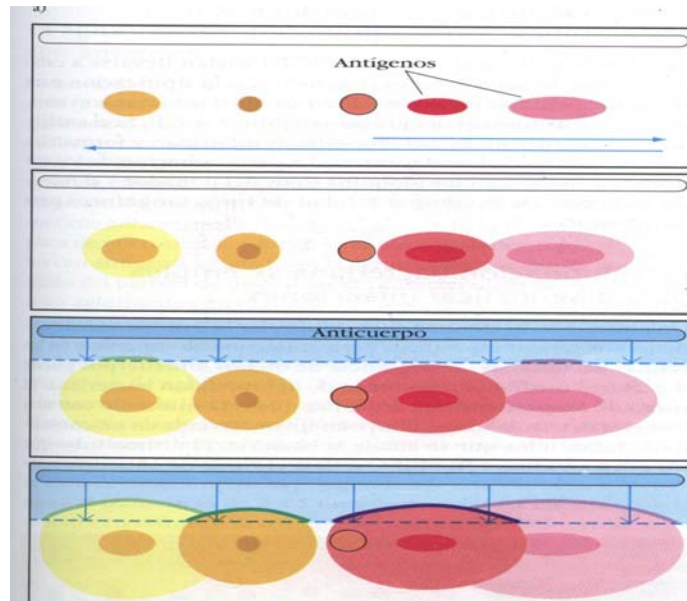


Figura 9. Representación de la secuencia de precipitación

5.4.2 Inmunolectroforesis doble unidimensional

Este método también se conoce como inmunolectroforesis a contracorriente, contra inmunolectroforesis y electroprecipitación. El principio básico de este método es la electroforesis simultánea de antígeno y anticuerpo en direcciones opuestas, a partir de pozos separados en gel, con la precipitación resultante en un punto intermedio entre sus orígenes.

Las desventajas principales de la doble difusión sin fuerza electromotriz son el tiempo que se requiere para la precipitación (24 horas) y la falta relativa de sensibilidad. La electroinmunolectroforesis doble en una dimensión puede producir líneas visibles de precipitación en 30 minutos, y es cerca de 10 veces más sensible que las técnicas estándar de doble difusión. Sin embargo, esta técnica sólo es semicuantitativa.

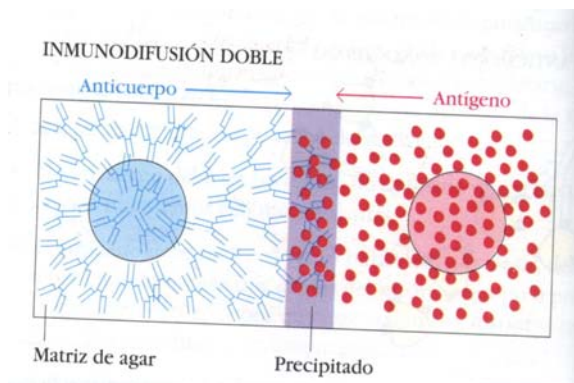


Fig. 10 Secuencia en el fenómeno de precipitación



Fig. 11 Reacción de precipitación en agar

5.4.3 ENZIMOINMUNOANÁLISIS

El empleo de enzimas como marcadores inmunoquímicos dio lugar a las técnicas de enzimoimmunoanálisis. Fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman.

Se basan en 2 fenómenos biológicos importantes:

- 1.- la reacción de un inmunoreactante con un antígeno o anticuerpo.
- 2.- la detección de ese inmunoreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

La unión covalente de enzimas a las moléculas de anticuerpos produce una herramienta inmunológica que posee alta especificidad y alta sensibilidad.

Estos conjugados el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción, en el cual el sustrato con un cromógeno se transforman en un producto colorido.

Los enzimoimmunoanálisis pueden clasificarse en:

- Homogéneos
- Heterogéneos

5.4.3.1 Enzimoimmunoanálisis homogéneo

Se realiza exclusivamente en fase líquida, el término inmunoanálisis homogéneo puede ser aplicado a cualquier sistema de reacción antígeno-anticuerpo; en el que sea posible medir el grado de reacción inmunológica sin separación de los componentes libres y marcados con anticuerpo.

En general son menos sensibles que los heterogéneos, en la actualidad su aplicación más importante es la determinación de productos de bajo peso molecular. Una técnica homogénea es la de EMIT.

5.4.3.2 Enzimoimmunoanálisis heterogéneo

Se emplea un soporte sólido para inmovilizar a uno de los inmunoreactantes, tienen, al menos un paso de separación para diferenciar entre el material que ha reaccionado y el que no lo ha hecho.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA se puede describir brevemente en los siguientes pasos:

- 1.- El antígeno o el anticuerpo se pegan a las placas de poliestireno o polivinilo.
- 2.- la placa se bloquea con una proteína irrelevante, para prevenir cualquier unión no específica.
- 3.- El antígeno o anticuerpo de prueba se adiciona y toda la proteína no pegada se elimina con los lavados.
- 4.- El antígeno o el anticuerpo se detecta por un ligando acoplado a una enzima. Este ligando se une al anticuerpo o al antígeno de prueba el ligando libre se elimina con los lavados.
- 5.- La unión del ligando se visualiza con la adición de un cromógeno, el cual es incoloro y mediante la acción de la porción enzimática del ligando se produce un compuesto colorido que es proporcional al anticuerpo o antígeno de prueba.

INMOVILIZACIÓN DE INMUNORREACTANTES EN FASE SÓLIDA

Las superficies a ser utilizadas en este tipo de ensayos deben reunir ciertas características:

- Alta capacidad de unión de inmunorreactantes (fases sólidas con una relación superficie/ volumen elevada).
- Deben ser capaces de inmovilizar diversos inmunorreactantes.
- Desnaturalización despreciable de la molécula inmovilizada durante los ensayos.

Soportes sólidos utilizados:

- Agarosa
- Celulosa
- Dextrán
- Vidrio
- Nitrocelulosa
- Plásticos (poliestireno y cloruro de polivinilo)

REQUISITOS QUE DEBEN REUNIR LAS ENZIMAS PARA SER UTILIZADAS EN ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS:

- Deben ser estables durante su almacenamiento, ya sea libres o conjugadas.
- Deben de ser de fácil preparación, obtenerse con elevada pureza y bajo costo.
- La actividad enzimática debe ser alta, ya sea como enzima libre o como conjugado.
- La actividad enzimática debe ser fácilmente detectable.
- Deben ser compatibles con las condiciones del ensayo (pH, fuerza iónica, composición de los buffers, etc.)
- Deben ser fácilmente conjugables a anticuerpos u otros sistemas de detección.
- La enzima del conjugado no debe estar presente en el componente que se fijará a la fase sólida.

Enzimas de utilización más frecuente:

- Peroxidasa de rábano
- Fosfatasa alcalina
- β -D-galactosidasa
- Glucosa oxidada
- Glucoamilasa
- Anhidrasa carbónica
- Acetilcolinesterasa
- Catalasa

CONDICIONES QUE DEBEN REUNIR LOS SUSTRATOS O COMPUESTOS CROMOGENICOS PARA SER UTILIZADAS EN ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS.

- Deben ser solubles en agua, incoloros, inodoros y no tóxicos.
- El producto formado debe poseer un alto coeficiente de extinción molar. Con un máximo de absorbancia entre 400 y 600 nm.
- Deben ser estables al almacenamiento y luego de la detención de la reacción enzimática.

- No deben ser fotosensibles.
- Debe haber un amplio rango de linealidad entre el color formado y la concentración de enzima.
- Que las cuales al ser oxidados durante la reacción enzimática desarrollan color.

Ejemplo:

- orto-fenilendiamina
- diamina bencidina
- orto-dianisidina

LA PRUEBA **ELISA** TIENE MÚLTIPLES VARIANTES

Se cuenta con algunas variaciones de ELISA que permiten la detección cualitativa o la medición cuantitativa de antígeno o anticuerpo. Cada tipo de ELISA puede usarse de manera cualitativa para detectar la presencia de anticuerpo o antígeno. De otra forma se prepara una curva estándar con base en concentraciones conocidas de anticuerpo o antígeno a partir de la cual es posible determinar la concentración desconocida de una muestra.

ELISA INDIRECTA

Por ELISA indirecta puede detectarse o determinarse en términos cuantitativos anticuerpo. Suero o alguna otra muestra que contenga el anticuerpo primario se añade a un foso de microtítulo recubierto con antígeno y se permite que reacciones con el antígeno unido al foso. Después de eliminar por lavado cualquier anticuerpo primario libre, la presencia de anticuerpo unido a antígeno se detecta mediante la adición de un anticuerpo antiespecie secundario conjugado con enzima, que se une al anticuerpo primario. A continuación se elimina por lavado cualquier anticuerpo antiespecie secundario conjugado con enzima libre y se añade un sustrato para la enzima. La cantidad de producto de la reacción de color que se forma se mide con lectores espectrofotométricos de placa especializados, que pueden medir la absorción de la totalidad de los fosos de una placa de 96 fosos en segundos.

ELISA EN EMPAREDADO

Es posible detectar o medir antígeno mediante una ELISA en emparedado. En esta técnica, el anticuerpo se inmoviliza en un foso de microtítulo. Se añade una muestra que contiene antígeno y se deja reaccionar con el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar el foso, un segundo anticuerpo ligado a enzima específico para un epitopo distinto del antígeno se agrega y se permite que reaccione con el antígeno unido. Tras eliminar cualquier segundo anticuerpo libre mediante lavado, se añade sustrato y se mide el producto de la reacción de color.

ELISA COMPETITIVA

ELISA competitiva es otra variante para medir cantidades de antígeno. En esta técnica se incuban primero anticuerpo en solución con una muestra que contiene antígeno. A continuación la mezcla de antígeno y anticuerpo se añade a un foso de microtítulo recubierto con antígeno. Cuanto más antígeno se encuentra en la muestra, menos anticuerpo libre está disponible para unirse al foso recubierto con antígeno. La adición de un anticuerpo secundario conjugado con la enzima específica para el isotipo de un anticuerpo primario puede utilizarse para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido al foso como en una ELISA indirecta. Sin embargo, en la prueba competitiva cuanto más alta es la concentración de antígeno en la muestra original, más baja es la adsorción.

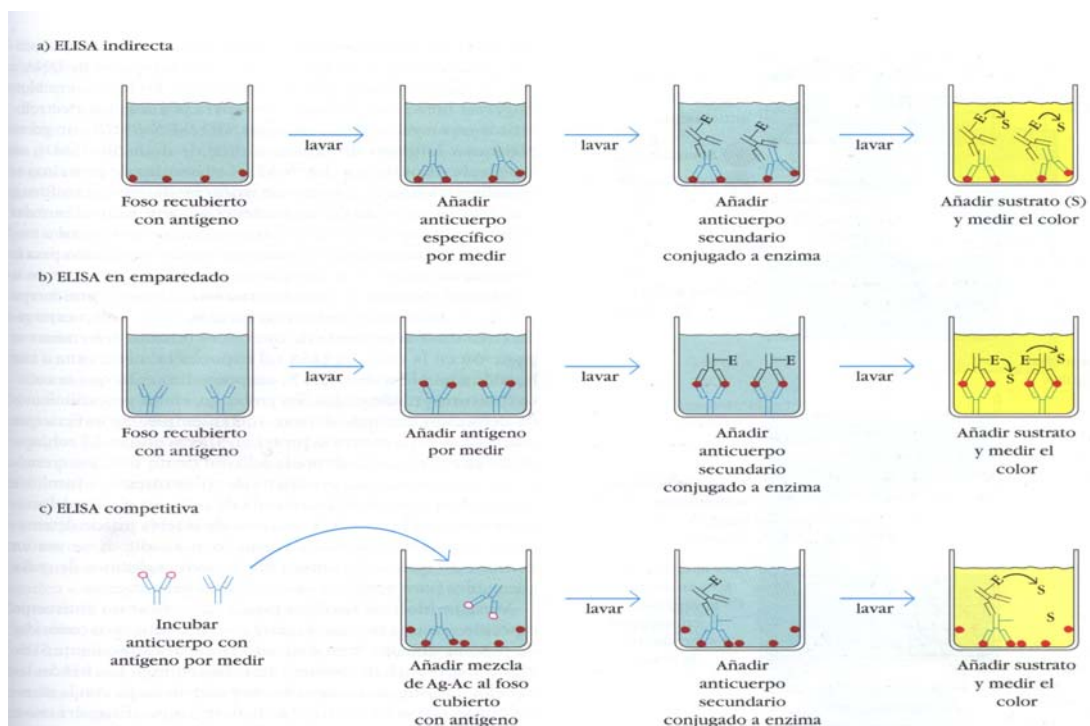


Figura 12. Metodología de las 3 variantes de ELISA

5.4.4 INMUNOFLUORESCENCIA

Para la cuantificación de antígeno específico prostático, este análisis asocia el método inmuno-enzimático de tipo sándwich en 2 etapas con una detección final mediante fluorescencia.

Las moléculas fluorescentes adsorben luz de una longitud de onda (excitación) y emiten luz de otra longitud de onda (emisión). Si las moléculas de anticuerpo se marcan con un colorante fluorescente, o fluorocromo, los complejos inmunitarios que contienen estos anticuerpos marcados con fluorescencia pueden detectarse por la emisión de luz de color cuando se excita con una luz de longitud de onda apropiada. Es posible observar de manera similar moléculas de anticuerpo unidas a antígenos.

5.5 INMUNOENSAYO ABACard p30 PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA DE LA PROTEÍNA P30 EN LA IDENTIFICACIÓN FORENSE DE SEMEN.

5.5.1 Principio de la técnica

Si la proteína p30 esta presente en la muestra, esta reaccionara con el anticuerpo monoclonal antihumano móvil y es así formado el complejo móvil antígeno anticuerpo. Este complejo antígeno anticuerpo móvil migra a través del dispositivo adsorbente hacia el área de prueba "T". en el área de prueba "T" , un anticuerpo antihumano monoclonal p30 está inmovilizado. Este anticuerpo inmovilizado captura el complejo mencionado, de esta manera, es que se forma un sándwich complejo anticuerpo antígeno anticuerpo. Las partículas del conjugado que toman un tinte rosado se concentran en una zona estrecha sobre la membrana. Cuando la concentración de p30 en la muestra excede los 4 ng/mL, las partículas con tinte rosado formarán una banda de color rosa en el área de prueba "T" indicando un resultado positivo. Como un control interno positivo, el conjugado p30 tinte-anticuerpo no puede ensamblarse al anticuerpo en el área de prueba "T", pero los conjugados son capturados por una inmovilización por un anticuerpo antiinmunoglobulina presente en el área control "C" formando un complejo. Las partículas con tinte rosado capturadas formaran una banda en el área de control "C", indicando que la prueba fue trabajada correctamente y se ha seguido el procedimiento apropiado. Así, la presencia de dos líneas coloreadas, una en el área "T" y otra en el área de control "C", indica un resultado positivo, mientras que una sola línea en área de control "C" habría indicado un resultado negativo.

5.5.2 REACTIVOS Y MATERIALES

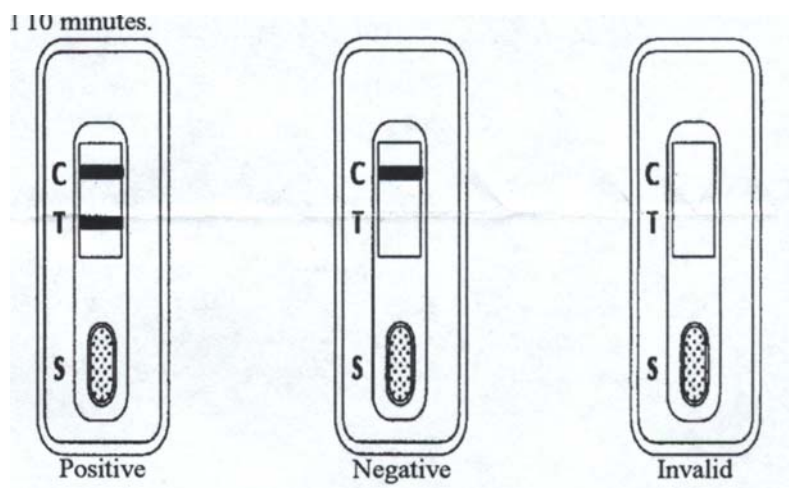
- Una placa inmunológica.
- Hisopos de algodón estériles.
- Un tubo que contiene buffer de extracción.
- Un gotero.

5.5.3 ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

El kit de detección de prueba ABACard p30 puede ser almacenado en un cuarto con temperatura debajo de 28°C. No se debe congelar. No usar la prueba después de la fecha de expiración.

5.5.4 PROTOCOLO DE LA PRUEBA

- Asegurarse que el extracto está a temperatura ambiente.
 - Sacar el dispositivo (placa) y el gotero de la bolsa sellada.
 - Etiquetar el dispositivo (placa) con el número de caso o averiguación previa.
 - Adicionar de 4 a 6 gotas de muestra (200µL) al pozo de muestra "S" de la placa de la prueba.
 - Leer el resultado antes de los 10 minutos. Resultados positivos pueden ser vistos ya en 1 minuto aunque depende de la concentración de la p30.
- Figura 13.



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Negativo: solo aparece una línea transversal rosa-rojo en la zona central del dispositivo de reacción alineada con la letra "C" (control). Siempre debe aparecer esta línea.
- Positivo: además de la línea control aparece otra línea transversal rosa-rojo en la zona central del dispositivo de reacción alineada con la letra "T" (test).
- No valido: si no aparece una línea "C" en la zona del control tras 10 minutos de la adición de la muestra probablemente no se ha procedido correctamente, o se ha añadido una cantidad incorrecta de muestra repetir el test con una nueva placa.

5.5.5 CONTROL DE CALIDAD

La línea de control en el área "C" puede ser considerado como un control de procedimiento interno. Una línea rosácea siempre aparecerá si la prueba ha sido realizada correctamente. Si la línea de control "C" no aparece, la prueba se invalida y una nueva prueba debe ser realizada siguiendo el procedimiento correcto de la prueba. Puede realizar un control de calidad usando un control estándar positivo y uno negativo.

5.5.6 SENSIBILIDAD

El límite mínimo de detección de la prueba ABACard p30 es de 4 ng/mL en 10 minutos. Pueden obtenerse resultados positivos en tan solo 1 minuto con muestras que contengan niveles elevados de p30. Para resultados negativos, debe esperar 10 minutos. El rango de p30 es de 200,000 a 5.5 millones de nanogramos/mL de semen. Por lo tanto, dependiendo de la concentración de p30, el fluido seminal diluido arriba de 1 a 1 millón puede ser detectado.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para la determinación del semen en el laboratorio de química forense, se realiza primero una prueba del tipo orientativa o presuntiva, la cual tiene como principio la reacción de la enzima fosfatasa ácida en presencia de un grupo fosfato y como consecuencia de la reacción se forma un azocompuesto colorido que por sus características es fácilmente observable.

Posteriormente se efectúa la búsqueda de espermatozoides, y dicha búsqueda tiene carácter de prueba confirmativa, aun que existe la posibilidad de no encontrar espermatozoides en las muestras y como consecuencia surge la duda existiendo la posibilidad de reportar un resultado falso negativo.

Es necesario contar con una prueba, que tenga las características de ser rápida, fácil, sensible, específica y de rutina, para reforzar el análisis y búsqueda de semen, para estar en posibilidades de obtener resultados altamente confiables, como es el caso de la prueba para la determinación de la proteína P30 en placa, con base a esto es aconsejable evaluar la especificidad y sensibilidad de dicha prueba inmunocromatografica en condiciones de trabajo en el laboratorio de química forense.

7. OBJETIVOS

- Evaluar la efectividad y especificidad de la placa, para la prueba inmunológica de la identificación de la proteína P30.
- Estimar la efectividad de la placa para la determinación de la proteína p30, empleando diversas diluciones de fluido seminal.
- Someter la reacción inmunológica para determinación de la p30, a diferentes condiciones ambientales y de embalaje solo con muestras de semen.
- Someter la reacción inmunológica para determinación de la p30, a diferentes condiciones ambientales y de embalaje con fluidos biológicos diferentes al semen.
- Realizar una búsqueda de la información bibliográfica relacionada a la investigación forense para la identificación de semen.

8. HIPOTESIS

El antígeno específico prostático es un componente estable e importante como marcador para la identificación de semen, es posible determinarlo usando una técnica inmunológica en la que se puede alcanzar una alta sensibilidad y especificidad en el análisis de indicios, sometiendo dicha determinación a diferentes condiciones de trabajo.

9. METODOLOGIA

9.1 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PLACA INMUNOLÓGICA “ABACard p30 ” A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SEMEN.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Recolecta, tamaño y preparación de la muestra.

Obtener una muestra de semen por masturbación, dejar reposar hasta que se encuentre completamente licuado (aproximadamente de 15 a 25 minutos), Medir con una pipeta graduada de 5 mL el volumen total de la muestra.

▪ PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN BUFFER

Solución a). Preparar una solución de fosfato ácido de sodio Na_2HPO_4 1/15 molar (9.47 gramos por litro).

Solución b). KH_2PO_4 1/15 molar (9.08 gramos por litro).

Buffer final: En un matraz volumétrico de 1000mL de capacidad, colocar 72mL de la solución a); 28mL de la solución b) y aforar a 1000 con solución salina (8.5 gramos de NaCl en 1000mL de agua destilada), el pH final deberá ser de 7.2.

- En tubos de ensayo de 18 X 150 realizar las siguientes diluciones: 1:50,000, 1:100,000, 1:200,000, 1:300,000, 1:350,000 y 1:400,000 a partir de 0.5 mL de semen, usar como diluyente Buffer de fosfatos pH 7.2.

El tamaño de la dilución se calculo en base a la sensibilidad del límite menor de detección de la prueba, mencionada en el inserto del kit.

Límite mínimo de detección es de 4 ng/mL leído antes de 10 minutos. Mientras que el rango de p30 es de 200,000 a 5.5 millones de ng/ml de semen.

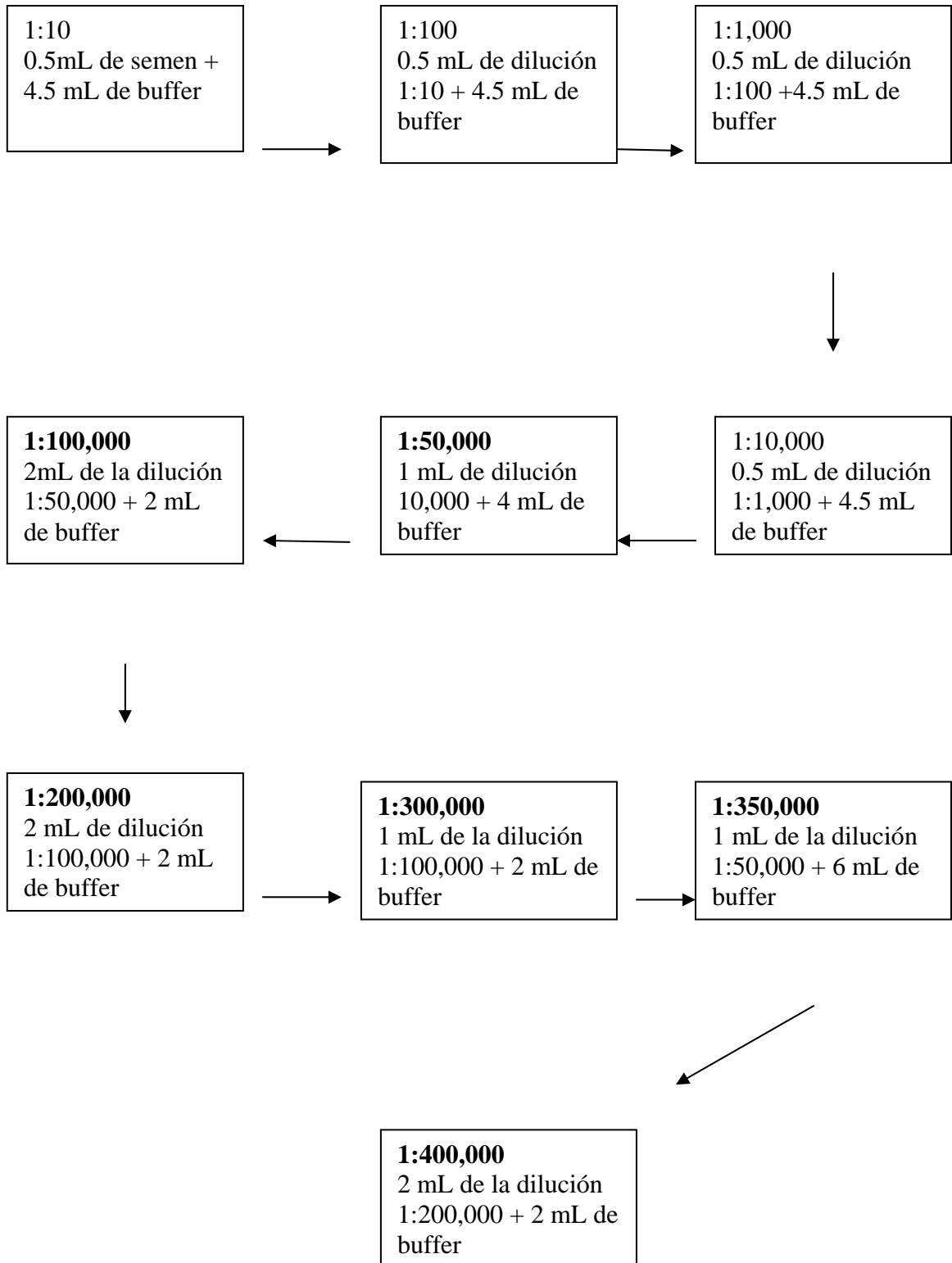
Suponiendo que la concentración de la muestra de semen es de 200,000 ng de p30 por un mililitro.

Calculo:

$$\text{Dilución} = (200,000 \text{ ng/mL} / 4 \text{ ng/ml}) = 50,000$$

Por lo tanto la dilución es de 1:50,000 con una concentración teórica de 4 ng/mL

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES:



- Una vez realizadas las diluciones, preparar 27 placas “ABAcad p30”, si se encuentran en refrigeración dejar a que llegue a temperatura ambiente.
- Extraer las placas de los sobres y colocarlos sobre una superficie plana, identificar cada placa como control positivo, control negativo, semen sin diluir y de acuerdo a cada una de las diluciones.
- Con la pipeta suministrada en el sobre agregar 7 gotas (200µL) de la dilución 1:100 (control positivo) en la ventana de la placa señalada como “S” (ventana de adición de muestra) y activar el cronómetro.
- Leer el resultado antes de los 10 minutos.
- Realizar el mismo procedimiento con el control negativo, semen sin diluir y con las diluciones 1:50,000, 1:100,000, 1:200,000, 1:300,000, 1:350,000 y 1:400,000.

RESULTADOS

Control positivo 1:100 de semen	Control negativo (buffer)	Semen sin diluir	1:50000	1:100000	1:200000	1:300000	1:350000	1:400000
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	positivo	Positivo	positivo	Positivo	Negativo
positivo	Negativo	Negativo	positivo	Positivo	positivo	Positivo	positivo	Negativo
positivo	Negativo	Negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo

En la dilución 1:350,000 fue la última en que la placa dio un resultado positivo. Se procedió a la determinación real de las diluciones 1:350000 y 1:1400000 teniendo 1.72 y 1.38 ng/mL respectivamente.

Técnica utilizada: sistema VIDAS-TPSA consiste en un análisis cuantitativo automatizado, que permite la medida semi-cuantitativa de las tasas de antígeno específico de próstata en suero o plasma humano, por la técnica Enzyme Linked Fluorescent Assay.

9.2 PRUEBA PARA LA ESPECIFICIDAD DE LA PLACA ABACard P30 CON FLUIDOS BIOLÓGICOS DISTINTOS AL SEMEN.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN FLUIDO HEMÁTICO

- En un varón coleccionar aproximadamente 3 mL de sangre en un tubo sin anticoagulante, la toma se debe realizar en condiciones asépticas.
- Centrifugar a 3000rpm por 3 minutos.
- Separar el suero, proceder a determinar la presencia de la proteína p30. como se indica en el protocolo de la prueba

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN ORINA

- Colectar aproximadamente 20 mL de orina perteneciente a un varón adulto
- Centrifugar a 3000rpm por 3 minutos
- Del sobrenadante realizar la determinación de la proteína p30

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN LECHE MATERNA

- Conseguir aproximadamente 5 mL de leche materna
- Centrifugar a 3000rpm por 3 minutos
- Del sobrenadante proceder a realizar la determinación de la presencia de la proteína p30.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA P30 EN SALIVA

- Colectar 3 mL de saliva perteneciente a un varón
- Centrifugar por 3 minutos a 3000rpm
- Del sobrenadante realizar la determinación de la proteína p30

RESULTADOS

muestra	sangre	orina	Leche materna	saliva
Resultados	negativo	negativo	negativo	negativo

9.3 ANALISIS DE LA EFECTIVIDAD DE LA PLACA “ ABACard p30” EN INDICIOS EN LA QUE SE PRESUME LA EXISTENCIA DE SEMEN.

TIPOS DE MUESTRAS QUE COMUNMENTE SE ANALIZAN EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE:

- hisopos con muestra de exudado vaginal
- hisopos con muestra de exudado anal
- hisopos con muestra de exudados en diferentes regiones del aparato reproductor externo en varones.
- En diferentes tipos de ropa.
- En superficies (en muebles, suelo, papel higiénico etc).

COLECTA DE LA MUESTRA:

Se puede usar una mancha con un área entre 0.5 cm² y 1.0 cm², es decir una mancha con perímetro entre 7.9 mm y 10.0 mm. Puede también tomar una mancha circular con diámetro entre 7.9 mm y 11.2 mm o un pedazo apropiadamente medido según el tamaño de hisopo. Las anteriores medidas son estimaciones pero se debe considerar los límites que pueden ser variados dependiendo de varios factores (edad de la muestra, condiciones ambientales, tiempo postcoital, etc.).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Para manchas e hisopos frescos, la extracción se realiza con el buffer que se encuentra incluido en el kit, o bien el uso de buffer de fosfatos pH 7.2 recién preparado. Sumergir la muestra (hisopo) en el buffer mezclar suavemente durante 5 minutos, extraer el sobrenadante usando un gotero, se procede a realizar la identificación de la proteína p30 con forme al protocolo de la prueba.

RESULTADOS**REGISTROS DE FOSFATASA ÁCIDA Y P30 DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA FORENSE.**

<i>Muestra</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Fosfatasa ácida</i>	<i>P30</i>	<i>Espermas</i>	<i>Fecha de toma de muestra</i>	<i>Fecha de análisis</i>	<i>Observaciones</i>
(1)	2 hisopos exudado vaginal	Positivo 38"	Positivo 2'	Positivo	14/02/06	14/02/06	Hisopos secos
(2)	Hisopo, no se indica tipo de exudado (Sexo femenino)	Positivo 17"	Positivo 2'	Positivo	14/02/06	14/02/06	Hisopos secos
(3)	2 hisopos, no se indica tipo de exudado (Sexo femenino)	Positivo 45"	Positivo 2'	Positivo	13/02/06	14/02/06	Hisopos secos
(4)	2 hisopos, no se indica tipo de exudado (Sexo femenino)	Positivo 40"	Positivo 2'	Positivo	13/02/06	14/02/06	-Hisopos secos -La cantidad de espermias en el frotis fue mínima
(5)	4 hisopos con exudado vaginal	Positivo 32"	Positivo 2'	Positivo	11/02/06	14/02/06	Hisopos secos
(6)	3 hisopos con exudado anal (Sexo masculino occiso)	Positivo Hubo desarrollo de color a los 5'	Negativo	Negativo	15/02/06	16/02/06	Hisopos secos
(7)	2 Hisopos con exudado vaginal	Positivo 15"	Positivo 2'	Negativo	15/02/06	16/02/06	-Hisopos secos -En frotis hubo carga bacteriana grande
	Pantaleta	Positivo 25"	Positivo 9'	Positivo	15/02/06	16/02/06	-Ninguna
(8)	Hisopo, no se indica tipo de exudado (sexo femenino, ofendida)	Negativo No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	14/02/06	16/02/06	-Hisopo contaminado con sangre -Frotis con alta carga bacteriana
	3 hisopos con exudado balano prepuccial (presunto agresor)	positivo Hubo desarrollo de color a los 1' 30"	Positivo 5'	Negativo	15/02/06	16/02/06	Hisopos secos
(9)	2 hisopos, no se indica el tipo de exudado	Positivo 40"	Negativo	Positivo	16/02/06	16/02/06	-Hisopos secos P30 resultó negativo pero si hubo espermias.
(10)	Hisopo con exudado vaginal (ofendida)	Positivo 50"	Negativo	Negativo	15/02/06	17/02/06	Hisopos secos
(11)	Hisopo exudado balano prepuccial	Positivo 45"	Positivo 3' 20"	Negativo	15/02/06	17/02/06	Hisopos secos (Presunto agresor)

Muestra	Tipo de muestra	Fosfatasa ácida	P30	Espermas	Fecha de toma de muestra	Fecha de análisis	Observaciones
(12)	Hisopo, no se indica tipo de exudado (Sexo femenino)	Positivo 15"	Negativo	Positivo	21/02/06	23/02/06	Hisopos secos
(13)	Hisopos, no se indica tipo de exudado (Sexo femenino, menor)	Positivo Hubo desarrollo de color al 1' 25"	Negativo	Negativo	21/02/06	23/02/06	Hisopos secos
	Pantaleta	Positivo 37"	Negativo	Negativo	21/02/06	23/02/06	En P30 hubo cambio a los 36'
(14)	Hisopo con exudado balano prepuccial	Positivo 2"	Positivo 1'	Negativo	23/02/06	23/02/06	Hisopo seco
(15)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 22"	Negativo	Negativo	28/02/06	01/03/06	-Hisopos contaminados con sangre -En frotis hubo alta carga bacteriana
	Pantaleta	Positivo 30"	Positivo 4' 45"	Negativo	28/02/06	01/03/06	-Pantaleta manchada con sangre -En frotis hubo alta carga bacteriana
(16)	3 hisopos con exudado anal	Positivo 30"	Positivo 2' 30"	Negativo	05/03/06	06/03/06	-Hisopos secos
(17)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 40'	Negativo	Positivo	06/03/06	06/03/06	-Hisopos húmedos -En frotis hubo alta carga bacteriana
(18)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo 25"	Negativo	Negativo	06/03/06	08/03/06	Hisopo seco
(19)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 20"	Negativo	Negativo	03/03/06	08/03/06	Hisopos secos
(20)	2 hisopos con exudado vaginal (ofendida)	Positivo. Hubo desarrollo de color a los 4'	Negativo	Negativo	03/03/06	08/03/06	Hisopos húmedos y con sangre
	Hisopo con exudado anal (ofendida)	Negativo. Hubo desarrollo de color a los 5'	Negativo	Negativo	03/03/06	08/03/06	Hisopo húmedo
(21)	3 Hisopos exudado balano prepuccial (presunto agresor)	positivo Hubo desarrollo de color a los 5"	Positivo 9'	Negativo	03/03/06	08/03/06	Hisopos húmedos

Muestra	Tipo de muestra	Fosfatasa ácida	P30	Espermas	Fecha de toma de muestra	Fecha de análisis	Observaciones
(22)	Hisopo, no se indica tipo de exudado (Menor, sexo femenino)	Positivo Hubo desarrollo de color a los 29"	Negativo	Positivo	08/03/06	08/03/06	Hisopos secos
(23)	2 Hisopos, no se indica tipo de exudado (Sexo femenino)	Positivo 30"	Negativo	Negativo	18/03/06	20/03/06	-Hisopos secos -Frotis con alta carga bacteriana.
(24)	3 Hisopos con exudado vaginal	Positivo 2"	Positivo 1'	Positivo	27/03/06	27/03/06	-Hisopos secos - Frotis con alta carga bacteriana.
	Pantaleta	Positivo. 2"	Positivo 1'	Negativo	27/03/06	27/03/06	Ninguna
(25)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo. 10"	Negativo	Positivo	23/03/06	28/03/06	Hisopos húmedos
	Pantaleta	Positivo 10"	Positivo 2'	Positivo	23/03/06	28/03/06	Ninguna
(26)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 5'	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Hisopos secos
	Pantaleta	Positivo 2"	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Ninguna
(27)	1 hisopos con exudado vaginal	Positivo 20"	Positivo 2'	Negativo	27/03/06	28/03/06	Hisopo seco
(28)	3 hisopos con exudado vaginal	Positivo 5"	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Hisopos secos
	Pantaleta	Positivo 3"	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Ninguna
(29)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo 2"	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Hisopo seco
(30)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo 20"	Positivo 7'	Positivo	27/03/06	28/03/06	-Hisopo seco con sangre. -Frotis con alta carga bacteriana; solo se encontraron cabezas de espermas
(31)	2 Hisopos exudado vaginal	Positivo. 30"	Negativo	Negativo	27/03/06	28/03/06	Hisopos húmedos
(32)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo. 15"	Negativo	Negativo	24/03/06	28/03/06	Hisopos húmedos

Muestra	Tipo de muestra	Fosfatasa ácida	P30	Espervas	Fecha de toma de muestra	Fecha de análisis	Observaciones
(33)	Hisopo con exudado vaginal	Negativo. No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	27/03/06	28/03/06	Hisopo seco
(34)	Hisopo con exudado vaginal (menor)	positivo Hubo desarrollo de color al 1' 10"	Negativo	Negativo	27/03/06	28/03/06	Hisopo seco
	Hisopo con exudado anal (menor)	Negativo. No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	27/03/06	28/03/06	Ninguna
(35)	3 hisopos con exudado vaginal	Positivo. 1'	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Hisopos secos
	Pantaleta	Positivo Hubo desarrollo de color a los 2'	Positivo 3'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Ninguna
(36)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo 1'	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	28/03/06	Hisopos secos
	Pantaleta	positivo Hubo desarrollo de color a los 1' 25"	Negativo	Positivo	27/03/06	28/03/06	Ninguna
(37)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 20"	Positivo 2'	Positivo	27/03/06	29/03/06	Hisopos húmedos
(38)	3 hisopos con exudado vaginal	Positivo 15"	Positivo 2'	Positivo	26/03/06	29/03/06	Hisopos húmedos
	Pantaleta	Positivo 16"	Positivo 2'	Positivo	26/03/06	29/03/06	Ninguna
(39)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo 23"	Negativo	Negativo	28/03/06	29/03/06	Hisopo seco
	Pantaleta	Positivo 10"	Positivo 3'	Positivo	28/03/06	29/03/06	Ninguna
(40)	2 Hisopos con exudado vaginal	Positivo. 30"	Negativo	Negativo	16/04/06	17/04/06	Hisopos secos
(41)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo. 15"	Negativo	Negativo	16/04/06	17/04/06	Hisopos secos

Muestra	Tipo de muestra	Fosfatasa ácida	P30	Espervas	Fecha de toma de muestra	Fecha de análisis	Observaciones
(42)	3 Hisopos con exudado vaginal (menor)	Positivo Hubo desarrollo de color a los 5'	Negativo	Negativo	15/04/06	17/04/06	Hisopos húmedos
(43)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 5"	Negativo	Positivo	20/04/06	20/04/06	Hisopos secos Frotis con alta carga bacteriana
	Pantaleta	Positivo. 3"	Positivo 1' 30"	Positivo	20/04/06	20/04/06	Ninguna
(44)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo. 6"	Positivo 6'	Negativo	27/04/06	29/04/06	Hisopos secos
(45)	Hisopo con exudado vaginal	positivo Hubo desarrollo de color a los 2'	Negativo	Negativo	27/04/06	29/04/06	Hisopos húmedos
	Pantaleta	Negativo No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	27/04/06	29/04/06	Ninguna
(46)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 1"	Positivo 3'	Negativo	28/04/06	29/04/06	Hisopos húmedos
(47)	Pantaleta	Positivo 5"	Positivo 2'	Positivo	02/05/06	02/05/06	Ninguna
(48)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo (+) 15"	Positivo (+) 2'	Positivo	02/04/06	02/04/06	Hisopo seco
	Pantaleta	Positivo 10"	Positivo 3'	Positivo	28/03/06	29/03/06	Ninguna
(49)	Pantalón de gabardina (Ofendida, sexo femenino)	Positivo 8"	Positivo 1'	Negativo	01/05/06	04/05/06	Ninguna
(50)	3 hisopos con exudado vaginal	Positivo. Hubo desarrollo de color al 1' 40"	Negativo	Negativo	03/05/06	04/05/06	Hisopos secos

Muestra	Tipo de muestra	Fosfatasa ácida	P30	Espermas	Fecha de toma de muestra	Fecha de análisis	Observaciones
(51)	2 Hisopos exudado vaginal	Positivo. 1"	Negativo en hisopo normal. -Dilución 1:100 positivo 2'	Positivo	07/05/06	09/05/06	Hisopos secos
	Pantaleta	Positivo 13"	Positivo 2'	Positivo	07/05/06	09/05/06	Frotis: se observaron solo cabezas de espermatozoides
(52)	Boxer (Ofendido, sexo masculino)	Positivo 4"	Positivo 2'	Negativo	16/05/06	17/05/06	Ninguna
	2 hisopos con exudado anal	Positivo 10"	Positivo 2'	Negativo	16/05/06	17/05/06	Frotis con alta carga bacteriana
(53)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo. Hubo desarrollo de color a los 5'	Negativo	Negativo	16/05/06	17/05/06	Hisopos secos con sangre
	Hisopo con exudado anal	Positivo. Hubo desarrollo de color a los 4'	Negativo	Negativo	16/05/06	17/05/06	-Hisopo seco. -Frotis con alta carga bacteriana
(54)	Hisopo con exudado vaginal (Ofendida)	Negativo. No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	08/05/06	18/05/06	-Hisopo seco contaminado con sangre. -Frotis con alta carga bacteriana
	Hisopo con exudado anal (Ofendida)	Negativo. No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	08/05/06	18/05/06	-Hisopo húmedo -Frotis con alta carga bacteriana
	Hisopo con exudado periuiretral (Presunto agresor)	Positivo Hubo desarrollo de color a los 2' 15"	Negativo	Negativo	08/05/06	18/05/06	Hisopo seco
	Hisopo con exudado balanoprepucial (Presunto agresor)	Positivo Hubo desarrollo de color al 1' 30"	Negativo	Negativo	08/05/06	18/05/06	Hisopo húmedo
	Truza (Presunto agresor)	Positivo Hubo desarrollo de color a los 2'	Negativo	Negativo	17/05/06	18/05/06	Ninguna

<i>muestra</i>	<i>Tipo de muestra</i>	<i>Fosfatasa ácida</i>	<i>P30</i>	<i>EspERMAS</i>	<i>Fecha de toma de muestra</i>	<i>Fecha de análisis</i>	<i>Observaciones</i>
(55)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo. Hubo desarrollo de color a al 1' 45".	Negativo	Negativo	17/05/06	17/05/06	-Hisopo húmedo -Frotis con alta carga bacteriana
(56)	Hisopo con exudado vaginal	Positivo 20"	Positivo 2'	Positivo	23/05/06	23/05/06	Hisopo seco
	Hisopo con exudado anal	Positivo 1"	Positivo 2'	Positivo	23/05/06	23/05/06	Hisopo seco
	Pantaleta	Positivo Hubo desarrollo de color al 1' 30"	Negativo	Negativo	23/05/06	26/05/06	Ninguna
(57)	3 hisopos con exudado vaginal	Positivo 45"	Negativo	Negativo	25/05/06	25/05/06	-Hisopo seco -Frotis con alta carga bacteriana
(58)	2 hisopos con exudado vaginal	Positivo 30"	Positivo 4' 30"	Negativo	04/06/06	06/06/06	-Hisopo seco con sangre -Frotis con alta carga bacteriana
(59)	2 hisopos con exudado vaginal (Ofendida)	Positivo 30"	Negativo	Negativo	14/06/06	23/06/06	-Hisopos secos -Frotis con alta carga bacteriana
(60)	2 hisopos con exudado balanoprepucial (Presunto agresor)	Negativo. No hubo desarrollo de color	Negativo	Negativo	14/06/06	23/06/06	-Hisopos húmedos -Frotis con alta carga bacteriana

En una muestra de 60 oficios de petición emitidos por el Ministerio público de los diferentes Centros de Justicia ubicadas al oriente y norte del Estado de México, se solicitaron la identificación de semen, se analizaron 86 muestras de las cuales 51 fueron positivas.

10. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

De las 86 (100%) muestras analizadas, en 79 (91.9%) hubo reacción de la enzima fosfatasa ácida de la cual 51 (59.3%) resultaron ser positivas en la identificación de semen, teniendo tiempos de reacción menos prolongados que en el resto de las muestras, debido a las altas concentraciones de fosfatasa ácida que se encuentra en el fluido seminal.

En las 28 (32.6%) muestras restantes en la que se observó reacción, posiblemente sea causa en el caso de muestras de exudado vaginal a la presencia de la fosfatasa ácida vaginal que es una enzima compuesta por 3 isoenzimas que son producidas en el endometrio. En muestras con sangre, contaminación microbiana, orina, también existe la posibilidad de dar resultados positivos en fosfatasa ácida. Por eso la técnica está catalogada como una prueba de orientación por no ser tan específica.

Tabla 5. Resultados de las muestras analizadas.

Fosfatasa ácida	P30	Presencia de espermatozoides	pruebas
Positivo	Positivo	Positivo	29
Positivo	Positivo	Negativo	15
Positivo	Negativo	Positivo	7
Positivo	Negativo	Negativo	28
Negativo	Negativo	Negativo	7

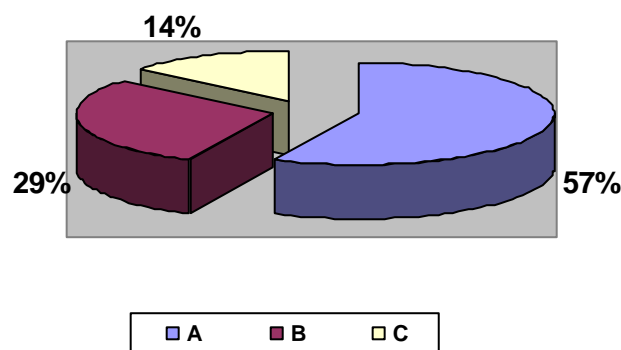
En referencia de las 51 muestras (100%) que dieron positivos en la presencia de semen, solo 29 (56.9%) se visualizó positividad en las tres pruebas realizadas. Por lo tanto es evidente que las características de las muestras antes de realizar el análisis es de gran importancia, se observó que en la mayoría de estas se encontraban en condiciones (secos, tiempo corto entre la toma de muestra y el análisis, contaminación bacteriana) en las que se puede conservar en un tiempo prolongado el analito como es el caso de la fosfatasa ácida, la proteína p30 y estructuras celulares de los espermatozoides.

En 22 muestras (43.1%) de las que resultaron positivas en la presencia de semen, 15 (29.4%) no se identificó espermatozoides, solo acción enzimática de la fosfatasa ácida y presencia de la proteína p30. Mientras que en 7 muestras (13.7%) no se identificó a la proteína p30 de lo contrario hubo reacción enzimática de la fosfatasa ácida y presencia de espermatozoides. Se observó que las condiciones en las que estos se encontraban antes de realizar el análisis comúnmente eran las siguientes:

- Presentaban cierta humedad
- El tiempo de la toma de muestra al tiempo del análisis en el laboratorio eran prolongados.
- Contaminación con polvo, heces, sangre, orina, etc.)
- Al observar la tinción al microscopio se identificó una gran cantidad de bacterias.

Con esto se favorece la proliferación de microorganismo, en consecuencia la alteración de ciertas sustancias o analitos y estructuras celulares que son utilizados para la identificación de semen.

Relación de la tres pruebas realizadas a cada una de las muestras positivas en la identificación de semen



A = Fosfatasa ácida positivo, p30 positivo, espermatozoides positivo

B = Fosfatasa ácida positivo, p30 positivo, espermatozoides negativo

C = Fosfatasa ácida positivo, p30 negativo, espermatozoides positivo

En la muestra numero 51 (hisopo con muestra de exudado vaginal) en la tabla de resultados, se identifico la presencia de espermatozoides, actividad de la fosfatasa ácida positiva, pero ausencia de la proteína p30, al diluir la extracción de la muestra 100 veces (1:100) se obtuvo un resultado positivo. Posiblemente la razón es que antes de diluir la muestra la concentración de la proteína p30 era muy alta ocasionando el fenómeno “efecto de gancho de dosis elevada”, cuyo fundamento se describe más adelante, por lo tanto si se sospecha de niveles elevados de p30 se debe de realizar previamente una dilución de la muestra para evitar resultados falsos negativos.

En la evaluación de la sensibilidad de la placa inmunológica ABACard p30 se llevo a obtener resultados positivos en concentraciones de 1.72 ng/mL, concentración que se encuentra 2.28 ng/mL por debajo de 4 ng/mL límite mínimo de detección especificado, dato que refleja que la prueba es de gran sensibilidad.

Al realizar la determinación de la proteína p30 con semen sin diluir se observo un resultado negativo, indicando que se presento el fenómeno de “efecto de gancho de dosis elevada” (High dose hook effect) originando resultados falsos negativos consecuencia a altas concentraciones de proteína p30. El mecanismo detrás de este efecto es que esas cantidades grandes de proteína p30 se ligan al anticuerpo para formar el complejo antígeno-anticuerpo pero también la proteína p30 libre migra hacia el área de la prueba “T”. El anticuerpo en el área de prueba “T” es bloqueado por la p30 libre. Por consiguiente, el complejo móvil antígeno-anticuerpo con el color rosa no se puede ligar al anticuerpo. Como resultado, no se formará ninguna línea rosa en el área de prueba “T” aunque haya mucha p30 en la muestra, por lo que da como resultado un falso negativo. En estos casos es necesario que la muestra puede ser diluida de 10 a 10,000 veces.

Después de determinar la presencia de la proteína p30 a los diferentes fluidos; sangre, orina, saliva de varón y leche materna, parece ser que la proteína p30 es el marcador a confiar para la identificación de semen, aunque existe la posibilidad de que en sangre y en orina de varones dieran resultados positivos. En orina se han identificado concentraciones de p30 en 260 ng/mL, en sangre el aumento de las tasas de la concentración de la proteína p30 (mayor a 4 ng/mL) se encuentra

asociado a patologías prostáticas tales como hiperplasia benigna o cáncer de próstata.

En la prueba inmunológica ABACard p30 se observó que el intervalo de tiempo en la positividad de las muestras era variable, posiblemente la razón de esta variabilidad se deba a las características de las muestras; concentración de la proteína p30, edad de la muestra, tamaño de muestra, si hubo lavado, condiciones de almacenamiento etc. El kit de prueba establece que el resultado no debe ser leído después de 10 minutos, ya que puede llevarse a cabo una reacción no específica y puede darse un falso positivo.

Es de gran importancia resaltar que la intensidad de ambas bandas, la banda control y la banda de prueba no debe compararse entre las pruebas que se realicen con ABACar p30 y ninguna interpretación cuantitativa se relaciona con las diferencias de la intensidad de color, la aparición de ambas líneas solo demuestra la presencia de la p30.

11. CONCLUSIONES

En hechos delictivos en la que se encuentran involucrados individuos vasectomizados o azoospermicos, el antígeno específico de próstata (p30) parece ser un marcador importante para la identificación de fluido seminal, por lo que es específico del sexo masculino, relativamente estable, que se detecta con facilidad, de forma confiable y con la detección de alta sensibilidad.

La prueba inmunológica ABACard p30 para la medición cualitativa de la proteína p30, diseñada para la identificación forense de semen, se determino que cuenta con una alta **sensibilidad** y **especificidad** que justifica que es efectivo para la búsqueda de semen en indicios que contienen pequeña cantidad de muestra, o bien en muestras que se encuentran en condiciones muy deteriorados.

La placa inmunológica ABACard p30 es una técnica rápida, sensible y de fácil realización, elementos que justifica que es confiable para poderla anexar como una prueba más de rutina para la identificación de semen en indicios forenses.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ◆ NOEL R. Rose Herman Friedman. **El laboratorio en inmunología clínica**. 2ª edición, Editorial Panamericana, Argentina, 1984.
- ◆ RICHARD A. Goldsby, Thomas J, Kindy B. **Inmunología**, 5ª edición, Mc Graw-Hill, México, 2004.
- ◆ ANIBAL Ricardo Margni, **Inmunología e inmunoquímica**, 5ª edición, editorial panamericana, Argentina, 1996.
- ◆ ROITT Ivan, Jonathan Brostoff. **Inmunología**, 5ª edición, Editorial Harcourt, España, 2000.
- ◆ GUYTON Arthur C. M. D. **Tratado de fisiología médica**, 10ª edición, Mc Graw-Hill Interamericana, México, 2001.
- ◆ STUART Ira Fox. **Fisiología humana**, 7ª edición, Mc Graw-Hill Interamericana, España, 2003.
- ◆ GANONG William F. M. D. **Fisiología médica**, 19ª edición, Manual moderno, México, 2004.
- ◆ STANLEY W. Jacob. **Anatomía y fisiología humana**. 4ª edición, Mc Graw-Hill Interamericana, México, 1982.
- ◆ DUORKIN A. Mario, Cardinali P. Daniel. **Bases fisiológicas de la práctica médica**, 13ª edición, Panamericana, Argentina, 2003.
- ◆ FUENTES Arderiu Xavier. **Códex del laboratorio clínico**, Editorial ELSEVIER, España, 2003.
- ◆ ANGEL Gilberto M. Mauricio Ángel R. **Interpretación clínica del laboratorio**, 5ª edición, Panamericana, Colombia, 1996.

-
- ◆ PETERSDORF G. Robert. **Harrison principios de medicina interna VOL. I.** 10^a edición, Mc Graw-Hill, México, 1999.
 - ◆ BENNETT J. Claude M. D. **CECIL Tratado de medicina interna.** 20^a edición, Mc Graw-Hill Interamericana, México, 1996.
 - ◆ VARGAS Alvarado Eduardo. **Medicina legal**, editorial TRILLAS, México, 1996.
 - ◆ KNIGHT Bernard. **Medicina forense de Simpson**, Manual Moderno, México 1994.
 - ◆ JAVIER Tello Francisco. **Medicina forense.** Editorial HARLA, México, 1991.
 - ◆ VARGAS Alvarado Eduardo. **Medicina forense y Deontología medica.** EDITORIAL TRILLAS, México, 19981.
 - ◆ FRANCO de Ambriz Martha. **Hematología forense y otras técnicas serológicas.** 4^a edición, Editorial PORRÚA, México, 2002.
 - ◆ MONTIEL Sosa Juventino. **Criminalística** tomo II, LIMUSA, México, 1993.
 - ◆ GRANDINI Gonzalez Javier. **Medicina forense**, Mc Graw Hill, México, 2004.
 - ◆ ALVA Rodríguez Mario. **Compendio de medicina forense.** 2^a edición, MENDEZ-EDITORES, México, 1999.
 - ◆ MORENO González Rafael. **Compendio de Criminalística.** 3^a edición. México: Editorial Porrúa, 2000.
 - ◆ MARTÍNEZ MS. **Medicina Legal.** 16^o edición. Ed. Méndez Editores: México, 1991.

- ◆ KAPLAN L A, Pesce A J. **Química Clínica: Técnicas de laboratorio-Fisiopatología-Métodos de análisis.** Editorial Médica Panamericana, Argentina, 1990.

- ◆ ACHAVAL A. **Manual de Medicina Legal Práctica Forense.** 3° edición. Ed. Abeledo-Perrot: Argentina, 1988.

- ◆ SOLÍS CB. **Técnicas de Tinción para Espermatozoides.** Reporte de Servicio Social. Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza. 1998.