

30
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

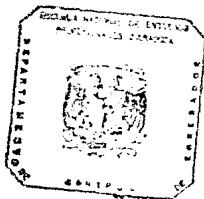
"ESTUDIO ELECTROFORETICO DE
PROTEINAS SEMINALES EN LIQUIDO
SEMINAL FRESCO Y SECO EN
INDIVIDUOS QUE HABITAN
LA ZONA METROPOLITANA".

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
B I O L O G O
P R E S E N T A N :
MARTHA PATRICIA OROZCO GOMEZ
GLORIA NIDYA VILCHIS DORANTES



MEXICO, D. F.



OCTUBRE, 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

Páginas

RESUMEN GENERAL

1

CAPITULO I.

I.1. INTRODUCCION.

2

I.2. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

7

I.3. GENERALIDADES.

11

I.3.1. FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR
MASCULINO.

11

I.3.2. COMPOSICION Y PROPIEDADES DEL LIQUIDO
SEMINAL HUMANO.

14

I.3.3. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LAS
PROTEINAS SEMINALES.

27

I.3.4. FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR
FEMENINO.

33

I.3.6. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DEL
LIQUIDO SEMINAL.

35

I.3.7. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LIQUIDO
SEMINAL.

37

I.3.8. OTRAS TECNICAS EN LA DETERMINACION
DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN MAN-
CHAS SEMINALES.

54

<u>CAPITULO II.</u>	Páginas.
II.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	56
II.2. OBJETIVOS.	57
II.3. HIPOTESIS DE TRABAJO.	58
<u>CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS.</u>	
III.0. ESQUEMA GENERAL DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.	59
III.1. FASES DEL TRABAJO EXPERIMENTAL. ETAPA DE MUESTREO.	60
III.1.1 TIPO Y FUNDAMENTACION DEL MUESTREO.	60
III.1.2 FASE 1.- ELECTROFORETICA.	62
III.1.3 FASE 2.- COLORIMETRICA.	62
III.1.4 FASE 3.- EMIT.	62
III.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.	63
III.2.1 MATERIAL.	63
III.2.2 EQUIPOS.	65
III.2.3. REACTIVOS.	67
III.3. TECNICAS EMPLEADAS.	71
III.3.1 ELECTROFORESIS.	71
III.3.2 COLORIMETRIA.	74
III.3.3 EMIT.	75

<u>CAPITULO IV</u>	<u>RESULTADOS</u>	Páginas
IV.1.	TABULACION Y GRAFICACION DE RESULTADOS OBTENIDOS.	76
	DESCRIPCION DE TABLAS Y GRAFICAS. RESULTADOS GENERALES.	
IV.2.	ELECTROFORESIS.	79
IV.3.	COLORIMETRIA.	94
IV.4.	EMIT.	99
<u>CAPITULO V.</u>		
V.O.	ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.	105
<u>CAPITULO VI.</u>		
VI.1.	CONCLUSIONES.	120
VI.2.	RECOMENDACIONES.	121
VI.3.	BIBLIOGRAFIA.	123

R E S U M E N G E N E R A L .

1

Se llevó a efecto un estudio de líquido seminal humano procedente de individuos que residen en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México con edad promedio de 36 años (20-52) el cual consistió en:

La electroforesis de microzona en acetato de celulosa y amortiguador de barbituratos identificando, en base al corrimiento electroforético de las proteínas, una separación de las bandas alfa, beta y gamma-globulinas así como la albúmina en porcentajes promedio de: 33.81 ; 69.53 ; 24.82 y 26.77 respectivamente.

La segunda basada en la acción de la FAP que hidroliza en p-nitrofenol y ácido fosfórico utilizando como sustrato el p-nitrofenilfosfato cuya extinción se lee por métodos espectroscópicos en la región del ultravioleta, obteniéndose para los intervalos de edad: 20-25; 26-30; 31-35 ; 36-40 ; 41-52 años una actividad enzimática promedio de 16.15 U/L ; 10.56 U/L ; 10.68 U/L ; 12.0 U/L ; 6.12 U/L respectivamente.

Por último se leyó un producto espectroscópicamente, el color que desarrolla la misma enzima e hidroliza el monofosfato sódico de timolftaleína a 590 nm. obteniéndose para los intervalos de edad de 20-25 ; 26-30 ; 31-35 ; 36-40 y 41-52 años la actividad enzimática promedio es de: 491.47 U/L ; 436.11 U/L ; 278.90 U/L ; 690.50 U/L y 460.30 U/L respectivamente.

CAPITULO I.

I.1. INTRODUCCION.

El estudio de la evidencia, hace que se pueda caracterizar e identificar al victimario del lugar de los hechos.

Antiguamente, la búsqueda de evidencias como prueba en actos delictuosos que quedaban impunes o no se comprobaban datan, desde 1248 en China (42). Siempre la inquietud de dicha búsqueda se manifiesta en las diferentes sociedades del mundo, llevándose a cabo un sinnúmero de estudios frecuentemente aislados en la víctima y que determina las causas de su muerte, tal como lo describe Ambroise Paré, francés, uno de los precursores de la Medicina Forense basado en los estudios de pulmones de niños estrangulados y en las huellas de crímenes sexuales (29).

En esa época, Ambroise Paré declaraba:

"estas evidencias son importantes ya que descubren e interpretan desde el punto de vista médico, procesos que desempeñan un papel en el esclarecimiento de crímenes y delitos", así como a un presunto victimario o delincuente, por lo que nacen varios tratados y códigos con base en este tipo de perspectivas hacia la investigación del crimen que sirvieron de guía para juicios y dictámenes.

Esta actitud científica provocó una serie de estudios microscópicos y químicos.

En 1879 L. Alphonse Bertillon crea la antropometría y - en 1877 William J. Herschel, la Dactiloscopia.

No es sino hasta antes de la 2a. Guerra Mundial en que la química, física y microbiología colaboraron con la criminalística, aplicando sus técnicas para la identificación de evidencias como: fibras y otros materiales biológicos, pelos, sangre, bacterias (29), y muestras en general co^llectadas del lugar de los hechos.

En actos delictuosos como la violación o asalto sexual, los fluidos corporales, en este caso el líquido seminal, es de suma importancia que se detecte, tanto en la víctima como en sus prendas, lo que en conjunto con otras evidencias coadyuvan a complementar el estudio ya que son una - prueba del acto delictuoso (42).

"Dentro de la Química Legal la identificación de líquido seminal, es de gran importancia en las investigaciones de raptos y crímenes que involucran asaltos sexuales". (7).

La identificación no sólo en sí del líquido seminal - como fluido biológico sino que también de sus componentes, ha despertado curiosidad, por sus connotaciones legales y fisiológicas, lo que ha motivado el desarrollo de técnicas que puedan aplicarse en el área médica y la química

forense, así como para el tratamiento médico de problemas de infertilidad.

En el año de 1888, Posner ya identificaba trazas de una proteína inusual en orina contaminada con líquido seminal. Por su parte Slontozoff reportó la presencia de nucleína, trazas de albúmina y mucina pero no especificó si trabajó con plasma seminal o con líquido seminal total (42).

Fürbringer estableció que las vesículas seminales contienen una secreción hialina y que se confiaba que fuera globulina. Es hasta 1935 con Goldblatt quién determina los constituyentes del plasma seminal humano que contiene proteosomas primarias y secundarias y una cantidad considerable de albúmina, nucleoproteínas y trazas de globulina y mucina (43).

La fosfatasa ácida es un componente que no sólo se encuentra en el líquido seminal o tejido prostático sino - que su actividad es ubicua en la naturaleza (45). En la vagina es parte de la secreción normal y es genéticamente igual que la fosfatasa ácida prostática o lisosomal (51). Sólo en las pruebas cuantitativas, la fosfatasa ácida prostática presenta niveles extraordinariamente altos de actividad, lo que justificaría los falsos positivos en la identificación de líquido seminal. (7)

En México las técnicas usadas para identificar líqui-

do seminal humano para fines legales incluyen de una forma general la observación microscópica de espermatozoides y la determinación cualitativa de fosfatasa ácida prostática (2). Sin embargo existen otros métodos que incluyen la detección de otros componentes seminales tales como la espermina, la colina, las proteosas, aminopeptidasas, fosfoglucomutasa y antígenos seminales de las que no son comunmente empleadas en el laboratorio de Química Forense, ya que su uso generalmente se ha enfocado hacia el área médica (54).

De las diferentes técnicas, que determina de forma cualitativa la actividad de la fosfatasa ácida prostática F A P, que está presente en grandes cantidades en el líquido seminal humano (Gutman y Gutman 1941), es una prueba que comunmente se emplea en el laboratorio químico forense, tanto en exudados vaginales como en otros objetos pertenecientes a la víctima, en ausencia de espermatozoides (7).

Las técnicas utilizadas para determinar la actividad de la fosfatasa ácida son: Métodos colorimétricos cualitativos y cuantitativos en donde los extractos de muestras sospechosas se tratan, con una solución de fosfato sódico alfa naftil (sustrato) y Brentamina Azul B last o Negro K last como reactivo de acoplamiento (Kind 1964); los métodos enzimáticos basados en la reacción con timolfta-

leína sódica monofosfatada (usado como sustrato, entre otros más) que por la acción de la enzima se hidroliza y su producto se lee cuantitativamente (2); las técnicas electroforéticas de la misma enzima (PAP) la diferencian de otras isoenzimas presentes y el radioinmunoensayo es utilizado como prueba más específica en la identificación de líquido seminal(32).

En la identificación de semen generalmente se aplica también el estudio microscópico del mismo en búsqueda de espermatozoides, componentes indispensables en la gran mayoría de los casos, del mismo y aunque morfológicamente no hay diferencia entre los de un posible sospechoso y otro, ya que presentan una forma común, su presencia es ya una evidencia del hecho de un intercurso sexual. Por esta razón algunos investigadores en bioquímica legal han creado técnicas para su extracción y separación por ultrasonido a partir de las ropas manchadas (28).

La aplicación de la electroforesis para identificar las proteínas seminales se inició con Gray-Huggins en 1942. Posteriormente en 1968 Quinlivan, analizó las proteínas del plasma seminal humano aplicando inmunolectroforesis (36).

La electroforesis e inmunolectroforesis se han aplicado muy poco en la identificación de las proteínas seminales en diferentes soportes electroforéticos y sólo en es-

tudios del área médica para resolver problemas de infertilidad y tener un mayor conocimiento de sus componentes. En cambio, la aplicación de la electroforesis al estudio de líquido seminal para fines legales, ha sido muy escaso o no existe.

Dentro de las técnicas implementadas en esta área, y actualmente en las investigaciones forenses de delitos sexuales en los Estados Unidos de Norteamérica, se aplica la técnica electroforética en gel de acrilamida para la identificación en cantidades trazas de la proteína " P 30".

Siendo ésta un marcador del líquido seminal de una alta confiabilidad. Debido a que ésta proteína no sufre variación con el tiempo, ni con el medio ambiente vaginal y aún en personas vasectomizadas o azospérmicas. (Sero-logical Research Institute Rich. Cal. U.S.A.).

Pero esta técnica además de requerir mucho tiempo para aislar e identificar la proteína, el material de trabajo y los reactivos deben ser manejados por personas especializadas, lo que la hace un poco incosteable para muchos laboratorios.

Por lo que se siguen estudiando diferentes métodos para la aplicación de la electroforesis.

En la actualidad se sigue investigando métodos ya no solo para la identificación si es o no líquido seminal,

sino que se estan adaptando poco a poco las técnicas de la Genética molecular para identificar a un presunto violador con las muestras que él deja sobre la víctima, muestras como pueden ser el cabello, sangre, semen, saliva o restos de su piel y vello púbico. Ya que la mayoría son mujeres e infantes, quedando a veces los victimarios impunes, no solo por el hecho de no ser denunciados por factores de coerción y amenaza en algunos casos sino también por la aplicación de una técnica de estudio inadecuada a las condiciones de la evidencia (28,32).

I.2 FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.

La incidencia de los delitos sexuales en el Distrito Federal del año de 1975 a 1990 fue de 16 096 casos. Y en enero a mayo de 1991 se observaron 828 casos según fuente: P.G.J.D.F. DIRECCION GENERAL DE AVERIGUACIONES PREVIAS (3).

Habiendo casos que no son denunciados, oficialmente lo que implica que los hechos de violación se incrementen de una manera considerable. No son denunciados debido a los factores socioculturales y psicológicos por la idiosincracia del país. (4).

Lo anterior resalta la importancia por conocer todos - aquellos aspectos científicos que de alguna forma nos conduzcan a la búsqueda e identificación del presunto sospechoso o "victimario" y contribuir al esclarecimiento de - este tipo de delitos dentro de nuestra sociedad (3).

En la actualidad, uno de los principales inconveniente de mayor discusión en el estudio de estos delitos es el - que se refiere a la investigación científica encaminada a esclarecer y perfeccionar una técnica más específica de laboratorio que auxilie en la identificación y caracterización de líquido seminal en los principales casos de - asaltos sexuales.

En este tipo de estudios es frecuente tomar como parámetros los valores reportados en otros países, sin tener

en consideración la existencia de factores de riesgo como los de tipo de conducta sexual, adicción a las drogas, genéticos, ambientales, nutricionales, de raza, etc. que pueden alterar los valores de referencia de la población en estudio, por lo que es necesario determinarlos en la misma población que se somete a estudio.

Por ello, el presente trabajo pretende contribuir en la investigación y a la aplicación de técnicas de laboratorio que cualifiquen y cuantifiquen proteínas seminales, delimitando la población en estudio a individuos que residan en la Zona Metropolitana y Cd. de México, con el fin de estandarizar el estudio electroforético de líquido seminal con esta población y poder así darle una aplicación a las investigaciones judiciales que se llevan a cabo dentro de los estudios de laboratorio.

1.3. GENERALIDADES.

11

1.3.1. FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO.

El aparato reproductor masculino consta de:

- 1) dos gónadas, testículos que producen espermatozooides y hormona sexual masculina (andrógeno);
- 2) un órgano copulador, el pene, mediante el cual los espermatozoides son depositados en la vagina de la mujer;
- 3) tubos y túbulos seminíferos que van desde los testículos al pene permitiendo que los espermatozoides sean almacenados y transportados hacia el órgano copulador;
- 4) glándulas cuya composición rica en músculo liso proporcionan medio líquido para los espermatozoides logrando una mezcla de secreciones y células (esperma) que será expulsado con fuerza por el pene observándose el fenómeno de la eyaculación(22,24).

Estos cuatro grupos de estructuras con funciones algo diferentes interactúan entre sí para finalmente producir líquido seminal o semen, que es el objeto de nuestro estudio.

En los testículos se encuentran los túbulos seminíferos y sus paredes están formadas de varias capas de células epiteliales que en su parte más íntima se transforman en espermatozooides. El epidídimo y los conductos deferentes llevan a cabo la maduración de los espermatozooides y en -

la próstata se produce un líquido de aspecto lechoso o - "secreción prostática" que contiene altas concentraciones de fosfatasa ácida, enzima que se desconoce su función pero su presencia en concentraciones elevadas se relaciona con tumores malignos de células secretoras prostáticas.

La espermatogénesis es el proceso por el cual las células germinales proliferativas están diferenciadas en espermatozoides testiculares, se requiere aproximadamente de 2 - meses en el hombre. El paso de los espermatozoides testiculares a través del epidídimo requiere otros 12 a 14 días. Los eventos metabólicos durante este período son de gran importancia en la adquisición de una capacidad normal fertilizadora. La maduración epididimal de los espermatozoides provistos ya de movimiento flagelar aunque no exhiben ningún movimiento progresivo bajo almacenaje en el caudal epididimal.

En la eyaculación, el fluido espermático epididimal - mezclado con las secreciones producidas por la próstata y las vesículas seminales constituyen aproximadamente el - 60% del volumen eyaculado y el 30% es de secreción prostática (41).

El volumen de la eyaculación inmediatamente torna a en volverse en mallas gelatinosas en el que son atrapadas - los espermatozoides que posteriormente, dentro de los 15 minutos siguientes observarán el fenómeno de la licuefac-

ción, comenzando a moverse progresivamente. El mecanismo que desencadena la motilidad espermática aún no se conoce (42).

1.3.2. COMPOSICION Y PROPIDADES DEL LIQUIDO SEMINAL HUMANO.

-- El producto biológico por examinar en el laboratorio químico forense al que se refiere el presente trabajo, es el líquido seminal humano o semen, el cual está constituido por células altamente diferenciadas llamadas espermatozoides, suspendidos en un medio líquido denominado plasma seminal, que contiene sustancias nutritivas que sólo son utilizadas por los espermatozoides (37,41,51).

La dualidad de los componentes del semen, espermatozoides y plasma seminal fué establecida inicialmente por Louis Nicolás Vauqueline en "Experiences sur le sperme humain" en 1791, aunque casi cien años antes, el 9 de junio de 1699 Antony van Leeuwenhoeck declaraba: "He descubierto las partes salinas y la forma de los animalcula en la simiente masculina".

Hoy sabemos que el proceso de transformación hasta llegar a espermatozoide denominado espermatogénesis y espermiogénesis da como resultado que un hombre sano, aprox. - de 25 años de edad, produce por día 150.000.000 de espermatozoides(41).

Los espermatozoides fijan a nivel de la cabeza durante su estancia en las células de Sertoli la enzima denomina-

da Hialuronidasa y la transportan hasta su utilización como coadyuvante en la disolución de la sustancia intercelular de la corona radiada del óvulo (acción desintegradora sobre mucopolisacáridos del tipo de ácido hialurónico en la sustancia intercelular).

La participación de los diferentes órganos que conforman el aparato reproductor masculino, a la producción de líquido seminal es la siguiente:

a) Testículos: Espermatozoides equivalen a menos del 5 % (gónadas) del volumen del semen.

Los espermatozoos almacenados en las porciones ampollares de los conductos deferentes son bastante inactivos metabólicamente, debido al medio ácido y a la disminución de oxígeno, con vida media de un mes en esta localización (22,41,51).

b) Vesículas seminales: Producen el 60% del volumen, líquido viscoso, amarillo contenido elevado de flavina, responsable de la fluorescencia del semen a la luz ultravioleta. Son también responsables del alto contenido de fructuosa, principal elemento nutritivo de los espermatozoides. Estas vesículas seminales contienen potasio y ácido cítrico, y en menor cantidad, ácido ascórbico, ergotioneína, y fosforilcolina (41,51).

c) Próstata: 20% del volumen total del semen. Produce un líquido lechoso, ligeramente ácido y pH alrededor

de 6.5; además contiene un elevado contenido en ácido cítrico principal anión de esta fracción del semen. La secreción prostática es rica en enzimas proteolíticas y en fosfatasa ácida, que al parecer, influyen en la coagulación y licuefacción seminales.

d) Epidídimos, conductos deferentes, glándulas bulbouretrales (gl. de Cowper y glándulas uretrales, equivalente al 10-15% del volumen total.

LIQUIDO SEMINAL O SEMEN TOTAL. (22 37, 41,51).

El semen, tal como es eyaculado, es un líquido viscoso constituido por zoospermos suspendidos en el plasma seminal, que en contacto con el medio externo, al momento de ser eyaculado, coagula transformándose en una masa gelatinosa, verdadero gel y el cual se desintegra entre 15 y 30 minutos, al producirse la llamada licuefacción del semen.

Características físicas:

- 1) Después de la licuefacción, se forma un líquido translúcido, turbio y viscoso con pH alrededor de 7.7. Por debajo - de pH= 7 posee gran cantidad de secreción prostática.
- 2) Viscosidad: Después de producida la licuefacción, el líquido seminal normal gotea en gotco individual, lo que permite conocer el grado de viscosidad seminal.

Un aumento de la viscosidad involucra la pérdida de - gran parte de la movilidad de los espermatozoides y se asocia con escasa invasión del moco cervical en estudios post-coitales.

- 3) Volumen: 3.1 a 5.2 ml., en promedio es de 3.65 ml.

El volumen del eyaculado seminal no varía significativamente con la duración del período de continencia (- Mac. Leod, 1951) y un aumento en el volumen se relaciona con escasa cuenta espermática.

- 4) Coagulación y Licuefacción Seminal. El proceso - ocurre en tres estadios (Mann, 1964):

- a) La coagulación :Se produce por la formación de un coágulo de fibrina (acción de enzima coagulante de la próstata).
- b) La licuefacción :Se inicia por acción de enzimas fibrinolíticas de origen prostático.
- c) Los fragmentos de fibrina se degradan posteriormente y forman aminoácidos libres y amoniaco (acción enzimática proteolítica). Si el semen no coagula se puede deber a una ausencia bilateral de los conductos deferentes y de las vesículas seminales por ausencia del sustrato de la coagulación (37,51). (Proceso de Degradación).

El líquido seminal humano es de color blanco-grisáceo o blanco amarillento y de aspecto translúcido y opalescente; de olor sui generis y por tanto característico.

Los límites de recuento de espermatozoides en un semen normal son de 60 a 150 millones por mililitro con promedio de 100 millones. Por debajo de los 20 millones se considera anormal, aun que puede haber impregnación del óvulo con éxito.

En cuanto a su motilidad, los espermatozoides requieren tener una gran actividad para penetrar en el moco cervical por lo que si menos del 60% exhiben una motilidad progresiva se considerará como anormal en las muestras

examinadas dentro de las primeras 3 horas de su recolección.

La morfología espermática se valora mediante el recuento diferencial de los tipos de espermatozoides morfológicamente normales y anormales en extensiones teñidas.

Además se observará la presencia de hematíes, leucocitos y células epiteliales en preparaciones teñidas y - en fresco.

Por su parte, Walter Goldblatt (1935) resume:

- 1.- El plasma seminal humano con respecto al sanguíneo tiene: Cl^- y Colesterol= 0.3 a 0.5 mg/100 ml.; Bicarbonatos: 0.7-1.0; Ca, glucosa y urea: 2.0-3.0; Acido láctico: 5.0-6.0; fósforo ácido-soluble (inorgánico 50%, espermina 30%, indeterminado 20%): 30
- 2.- Las proteínas del plasma seminal incluyen: mucina (trazas y proteosomas (primarias y secundarias).
- 3.- La Glicólisis puede demostrarse en el plasma seminal si los espermatozoides están presentes. Esto está asociado con un gran incremento en ácido láctico pero más tarde se considera la pérdida de reducción de -- fuerza. La diastasa y tromboquinasa han sido demostradas también en el plasma seminal.

En la siguiente tabla se da una comparación de la composición del plasma sanguíneo y del plasma seminal (16).

COMPOSICION DE PLASMA SANGUINEO Y SEMINAL.

PARAMETROS	PLASMA SANGUINEO 100 ml.	PLASMA SEMINAL 100 ml.
pH	7.4	7.2-7.3
NaCl (g)	0.59-0.60	0.20
CO ₂	50-70	50
P inorgánico (mg.)	3-4	40-50
P ácido-soluble (mg.)	3-4	95
Espermina P (mg.)	---	15-30
Calcio (mg.)	10	24-25
Glucosa (mg.)	100	200-300
Urea (mg.)	30	72
Acido láctico (mg.)	15-20	90-100
Colesterol (mg.)	150-200	80

Referencia : (16).

CONSTITUYENTES DEL PLASMA SEMINAL HUMANO

PARAMETROS	REACCION	INTERVALO
pH	colorimétrica	De: 7.5 a 7.8 ¹ 7.26 en emi ₂ sión inmediata.
Bicarabonato (HCO ₃ ⁻)	Van Slyke ³	De: 22mM CO ₂ /L . 14.6 mM./L .
Cloruro	Van Slyke ⁴	Promedio: 0.197 g/100 ml. como NaCl Secreción prosta to-vesicular: Mc. Carthy (1928) = 0.231 g/100 ml. Fluido seminal: 0.164 g/100 ml. -Vasectomizados: 0.164 g/100 ml. Fluido Prostáti- co: 0.355 g/100ml.

¹ Está establecido que en condiciones fisiológicas de alcalinidad del fluido seminal es necesario para prevenir inmovilización de las células espermáticas por la secreción ácida de la vagina.

² Tener gran cuidado para prevenir contaminación con residuos urinarios. Tal pH bajo comparado con el sanguíneo va de acuerdo con contenidos altos en aminoácidos, fosfato y ácido

CONTINUACION.

PARAMETROS	REACCION	INTERVALO
		INDICADOR
Fosfato	Briggs ⁵	Fósforo total ácido-soluble=95 mg. /100 ml. Fósforo inorgánico. =70 mg /100 ml.
Calcio (Calcio hidrógeno-fosfato; bicarbonato calcio y calcio = protefina).	Kramer and Tisdal	24.5 mg /100 ml. ⁶ 20.8 mg /100 ml.
UREA	-----	72 mg ./100 ml.
Sustancias Reduc-toras.	Método Mac. Lean.(o del Cobre). Mét. Hagedorn y Jensen (o del-ferricianida).	Fluido caliente: 291 mg ./100 ml. como glucosa. Fluido sin calentar: 291 mg /100 ml. Plasma: 280 mg./100 ml. como glucosa.

...láctico.

³El plasma seminal es tratado con un ácido mineral liberando dióxido de carbono.

⁴Usando el método para sangre y expresado como NaCl.

⁵Briggs estima fósforo inorgánico.

⁶El origen de las altas concentraciones de calcio es probablemente de próstata.
Mc. Carth et. all. (1928)= 66 mgs./100 ml. de calcio en - secreción prostática y de 23.3 mgs./100 ml. para vasectomizados.

CONTINUACION.

PARAMETROS	REACCION	INTERVALO
		INDICADORES
Acido láctico	Método Friede- man Cotgnio y Shaffer .	Semen recién eya- culado=80 mg/100 ml. Después de - 20 horas de incu- bación a 38°C= 140 mg /100 ml.
Colesterol	Métodos séricos	82 mg ./100 ml. ⁸
PROTEINAS:		
1) Nucleoproteína	Acidificar con ác. acético. AL 1%.	Precipitado.
2) Mucina	Centrifugación	
3) Globulina	Dilución del - plasma seminal con agua	Precipitado.
4) Albúmina	Filtrado de la dil. de la glo- bulina, proteí- na coagulable en el filtrado a pH = 5.5.	Precipitado.
5) Propeptona	Filtración	Proteína no coagu- lable.
6) Hemialbuminosa	-----	
7) Proteosa	Removible de la proteína coagu- lable por ebu- llición a pH=5.5 más filtración.	Filtrada de la Reacción de Biuret rosa.

CONTINUACION.

PARAMETROS	REACCION	INTERVALO. INDICADOR.
a) Proteosa primaria y secundaria.	Saturación con sulfato de amonio más ultracentrifugación en membrana coloidal bajo presión de 50 mm.	en solución.
8) Tioalbuminosa	*) Remover proteína coagulable por ebullición a pH=5.5 1) Precipitación-Filtración. 2) Saturación con sulfato de amonio. 3) Adición de alcohol absoluto.	Precipitado
9) Synalbumosa	1) Saturación con sulfato de amonio.	Precipitado.

⁷ Se determina en el ácido túngstico filtrado tratado con sulfato de cobre e hidróxido de calcio.

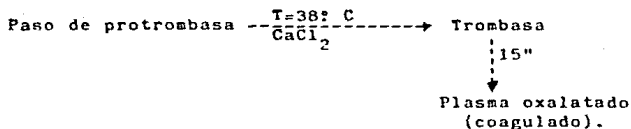
⁸ La extracción con cloroformo no es selectiva para el colesterol por lo que puede interferir la extracción de otras sustancias con la pureza del color obtenido con anhídrido acético.

CONTINUACION.

PARAMETROS	REACCION	INTERVALO.
Diastasa ⁹	Karassik (1927)	Actividad entre pH=6 y 7
Actividad glicolítica.		No existe en ausencia de espermatozooides.
Tromboquinasa ¹⁰	*) Adición alcohol abs. +) Filtración. ') Destilación a presión reducida a 42°.C a 10 ml. de agua.	Coagulación del plasma.

⁹ (Diastasa)= de 3 a 4 ml. de plasma seminal produce una cantidad más simple de glucosa.
ejemplo: glicógeno de la vagina y el cérvix.

¹⁰ La presencia de tromboquinasa fue probada por:



Referencia: (16).

En la actualidad, el análisis químico del líquido seminal revela que contiene las sustancias que se enumeran en la tabla siguiente, misma en la que se encuentran consignadas las cifras que limitan la zona de normalidad de las mismas.

LIQUIDO SEMINAL O SEMEN TOTAL	

Estudio químico	
Concentración de iones hidrógeno pH 7.1-7.7	
Fructuosa	851.6-4943.3 μ g/ml. (generalmente 1200-3500)
Fosfatasa ácida	770-3750 U.K.A /ml. (generalmente 1000-3500)
Acido cítrico	338-2203 mg./100 ml.
Fosfatasa alcalina	30-200 U.K.A./100 ml.
Acido ascórbico	13mg/100 ml.
Colesterol	70-120 mg/100 ml.
Espermina y espermidina	90-200 mg/100 ml.
Zinc	470 μ g/100 ml.
Proteínas	1.58-1.80 g/100 ml.
Sodio	104-138 mEq/L.
Potasio	14-27 mEq./L.
Cloruros	28-57 mEq./L.
Calcio	10-14 mEq./L.
Magnesio	10-11 mEq./L.

Referencia: (41).

1.3.3. CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS SEMINALES.

En general, las proteínas son macromoléculas complejas y heterogéneas compuestas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, quienes les confieren propiedades de carga eléctrica en solución dependiendo del pH en que se encuentren, por lo que pueden ser anfotéricas e tener carga ya sea positiva o negativa, observándose a pH alcalino y carga (-) un buen corrimiento electroforético. Aunque se han reconocido que ciertas proteínas contienen materiales diferentes a los aminoácidos, proporcionándoles propiedades específicas y algunas características como son: reacción con carbohidratos, lípidos e nucleótidos, distinguiéndose predominantemente como cromoproteínas, glucoproteínas, lipoproteínas o nucleoproteínas. (24, 48).

Las proteínas que se encuentran en líquido seminal son muchas, se han encontrado hasta 30, pero no todas se han identificado, a pesar de la aplicación de diversos métodos químicos, seminológicos, físicos y electroforéticos.

También se han identificado varias proteínas seminales que se localizan como: albúmina, alfa-globulina, beta-globulina y gamma-globulina, además de alfa-antitripsina, transferrina, IgA, IgG, IgM, orosomucoide,

lactoferina alfa₁-seromucoide, alfa₂-macroglobulina, ceruloplasmina, espermina, espermidina, prostaglandinas, nucleoproteínas, nucleína, enzimias tales como fosfatasa ácida, fosforileclina, hialuronidasa, proteasas y propeptonas y que generalmente se van a encontrar entre los grupos alfa, beta y gamma ya mencionadas. (8 10).

No se sabe bien el lugar de donde proviene cada una de ellas en el aparato reproductor masculino, sin embargo por la eyaculación en split² se cree que las glándulas de Cowper y Littré dan un fluido rico en mucoproteínas (0.1 a 0.2 ml.)

El fluido prostático con ligera acidez de 6.5 produce la fosfatasa ácida, la espermina, espermidisina (de acción bactericida) y la amina alifática.

Las células de Sertoli (testículos) la transferrina, las vesículas seminales producen las glicoproteínas, las prostaglandinas de origen en discusión, por la próstata y vesículas seminales.

La gliceril fosforil colina por epitelio epididimal (18,19,28,30,32). la albúmina, proteína transudada del plasma (2) siendo las aminotransferasas, enzimas proteolíticas de origen posiblemente prostático, enzimas que van a hidrolizar a las proteínas seminales incidiendo en un aminoácido terminal y que se inactivan conservando el semen de -10 °C a -20 °C sin afectar mucho a las proteínas (18,30). Por otra parte se encuentra que si afecta a las proteínas la refrigeración inespecífica entre las 4 y 96 horas (18).

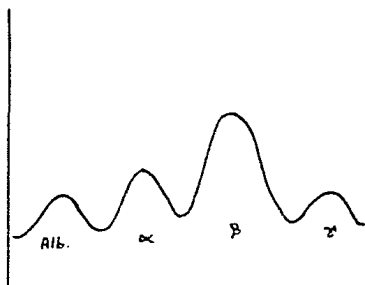
Se ha observado que en las eyaculaciones frecuentes como son las recolectadas a las 24 y 72 hrs. disminuyen la concentración de proteínas. También se ha observado que existen variaciones entre las con-

centraciones de las proteínas de un individuo a otro e intraindividual a diferentes eyaculaciones. Siendo la albúmina y la lactoferina estables entre sí.

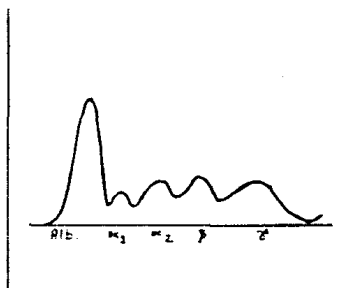
Generalmente las proteínas seminales que se han observado de bajo peso molecular, tales como las glicoproteínas o la fosfatasa ácida entre otras (35).

Los porcentajes promedio de las principales proteínas en semen total encontrados por Gray and Huggins son:

Albúmina = 19.1% ; alfa-globulina = 21.3% ; beta-globulina = 39.6% y gamma-globulina = 19.1 %.



Patrón electroforético de líquido seminal por Victor Ross y Dan Moore



Patrón electroforético de proteínas de suero serguíneo.

Generalmente las separaciones electroforéticas de las proteínas séricas dan 5 bandas en acetato de celulosa: albúmina, alfa₁ globulina, - alfa₂-globulina, beta-globulina y gamma- globulina. En el plasma seminal se observan 4 separaciones: albúmina, alfa, beta y gamma globulinas observándose algunas veces el desdoblamiento de las alfa globulinas (alfa 1 y alfa 2)

La albúmina es la proteína más homogénea con un peso promedio de 66000 Daltons, sintetizada en el hígado .

Las fracciones globulínicas son una mezcla compleja de algunos componentes como: mucoproteínas y glucoproteínas principalmente en las - fracciones alfa₁ y alfa₂, otras contienen lípidos como las globulinas beta. La fracción A de las lipoproteínas beta son ricas en grasa con peso molecular de 1,300 000⁰ presentes en gran cantidad en semen (Gray & - Huggins).

Las lipoproteínas que emigran con las globulinas alfa contienen menos grasa y mayor proporción de proteínas con peso molecular alrededor de 200, 000 D.

La fracción de gamma-globulinas contiene los anticuerpos circulantes: las inmunoglobulinas con P_{eso Molecular} aproximado de 160, 000 D y sedimentación de 7 S. (11).

PROTEINAS SEMINALES QUE SE IDENTIFICARON POR ELECTROFORESIS.

El plasma seminal humano mostró en este estudio, que contiene 6 proteínas, como : albúmina, transferrina e inmunoglobulina G y 3 por su localización tal como una prealbúmina, alfa 1 globulina y alfa 2 globulina, descritas ya anteriormente (18, 19).

Por otra parte, estudios sobre la constancia de transudados y proteínas que se producen en el plasma seminal humano (13) revelaron por medio de la cromatografía de filtración en gel y el uso de la electroforesis de alta resolución, la presencia de treinta proteínas diferentes entre las que se encuentran:

Lactoferrina	Anti-tripsina
Albúmina	Complejo de Globulinas (alfa, beta gamma, así como las inmunoglobulinas
Transferrina	IgG, IgM entre otras).
Seminogelina	
Espermina	Orosomucide

entre las conocidas, así como las propeptonas y peptonas, proteasas (larías. y 2arias), diastasa, tromboquinasa principalmente detectadas y en especial la PAP.

La PAP es una proteína muy especial, con actividad enzimática, la fosfatasa ácida prostática, que se encuentra en cantidades elevadas en el líquido seminal humano, por lo que para cuestiones del presente trabajo que tratará más ampliamente.

LA FOSFATASA ACIDA.

La fosfatasa ácida humana (AP) son un grupo de enzimas y se presenta en formas moleculares múltiples. La fosfatasa ácida prostática (PAP), una de las isoenzimas de la AP, es sintetizada por las células endoteliales de las glándulas prostáticas y es secretada principalmente en el fluido seminal extendiéndose un poco a orina.(51).

En las investigaciones forenses que involucran asaltos sexuales, la determinación de esta enzima es un procedimiento esencial de laboratorio. Es usada como una prueba inicial cuando examinando el exudado vaginal, se busca la presencia de semen.

La fosfatasa ácida posee otras dos variedades o isoenzimas presentes en los eritrocitos y en las plaquetas además de la que se encuentra en la secreción prostática (51).

Además, existe la evidencia de que la AP propia de semen no es única sino que también esta presente en la cavidad vaginal en secreciones normales y ambas son genéricamente idénticas a la fosfatasa ácido lisosomal encontrada en casi todos los tejidos. (7,8,9).

1.3.4. FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO.

El aparato reproductor femenino está formado por dos ovarios, dos oviductos (denominados también trompas uterinas o de Falopio), un útero, una vagina, genitales externos y dos glándulas mamarias. (22).

1) Ovarios. Son cuerpos ovoides, sólidos, algo aplanados, de forma y tamaño aproximado a los de almendras sin cáscara.

2) Oviductos. Las trompas son los conductos que reúnen - los ovarios con el útero; cada una está recubierta de peritoneo (el ligamento ancho es su mesenterio). A diferencia de los espermatozoos, un óvulo no puede desplazarse por sus propios medios; después que alcanzó el extremo libre de la trompa tiene que ser transportado hacia la cavidad uterina por la acción de las paredes de la trompa.

3) Utero: El útero (matriz) es un órgano muscular hueco de paredes gruesas, situado en el centro de la pelvis y de forma de una pera invertida.

4). Vagina. del latín =vaina es un tubo aplanado. Sirve de vaina para el órgano sexual masculino durante el coito. Sus paredes están formadas principalmente de fibras muscular lisa y de tejido conectivo fibroelástico de pocos milímetros de espesor.

La vagina posee además defensas antibacterianas que - además representan algunas de sus principales caracterís-

ticas como:

a) El pH: La acidez de la vagina adulta (pH=4 a 4.5), causada por el crecimiento de lactobacilos, frena el crecimiento de muchos microorganismos que toman contacto con su superficie. A diferencia del semen que, el principal factor de esterilización para ser una poliamina, la espermina, que es bactericida a una gran variedad de bacterias patógenas (9).

b) La FLORA Normal: En la mujer, las regiones uretral y vaginal presentan casi una extensa flora microbiana, la cual depende en gran parte del contenido en glicógeno del epitelio vaginal. Forman parte de la flora normal: el Bacilo de Döderlein (*Lactobacillus* sp.) en grandes cantidades, el grupo de los coliserógnos, estafilococos, estreptococos (aerobios y anaerobios), levaduras, bacteroides, *Vaillonella* y *M. smegmatis*. (10,9,8).

I.3.6. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LIQUIDO SEMINAL.

Exámen de la Presencia de Semen:-

A menudo se encarga al laboratorio que compruebe la presencia de semen procedente de la vagina o que se encuentre impregnado sobre la ropa, piel o pelo de la víctima. Tales casos generalmente tienen que ver con una supuesta violación o con una sospecha de asalto sexual, seguido de homicidio, en algunos casos. En casos medico legales están indicadas las precauciones especiales para identificar adecuadamente las muestras y para mantener la secuencia de hechos evidentes.

*) Obtención de la muestra:

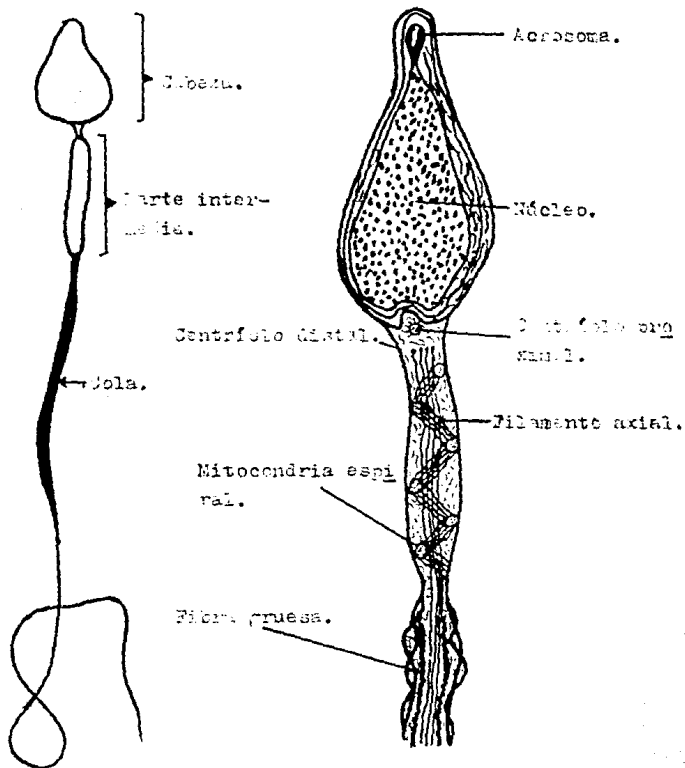
Las secreciones vaginales pueden obtenerse mediante aspiración directa o con un lavado salino. Una visualización previa con luz ultravioleta puede ser útil en la selección de áreas específicas para una posterior investigación. Se cortará un trozo de 1 cm² del área del tejido manchado y que se cree es líquido seminal y se empapará en 1 ó 2 ml. de suero fisiológico durante 1 hora. El líquido resultante de este lavado podrá someterse a otras pruebas para investigar si hay líquido seminal. Se incluye como control un trozo de tejido lejano a la mancha, especialmente para la determinación de fosfatasa Ácida y para la detección de sustancias relacionadas con el grupo sanguíneo.

- *) Exámen de espermatozoides (Se hace un frotis y se observa al microscopio con el objetivo 40 X).
- *) Determinación de fosfatasa ácida.

La fosfatasa ácida se determina en el aspirado vaginal o en el lavado de las manchas o de exudados.

Los valores altos de fosfatasa ácida proporcionan una positiva para la identificación de líquido seminal, incluso si el semen en cuestión procede de varón azoospermico. El líquido seminal, posee un promedio de aproximadamente 2 500 UKA/ml de fosfatasa ácida; mientras que otros líquidos corporales y otras sustancias extrañas tienen menos de 5 UKA/ml. La fosfatasa ácida puede determinarse fidedignamente en el líquido procedente del lavado de manchas seminales que tienen muchos meses de guardadas en condiciones ideales (resguardadas de humedad, a temperatura ambiente, protegidas las muestras por medio de una bolsita de plástico y sellada externamente).

ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE :



I.3.7. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LIQUIDO SEMINAL.

Antecedentes de electroforesis (Principios).

Introducción:

Las teorías electrolíticas se describieron por Murphy y Rosseau (1963), sin embargo ya el comienzo de la electroforesis data con Alexander Reuss en 1807, cuando observó - que al pasar una descarga eléctrica a través de un tubo - con agua y arcilla, las partículas arcillosas se movían - al electrodo positivo. En 1834 en Inglaterra, Michel Faraday presentó en su artículo intitulado "Sobre la descomposición química" diferentes teorías electrolíticas introduciendo los términos electrodo, electrolito, electrólisis, catión y anión(20,40,44), demostrando que algunas - partículas con carga negativa en solución o suspensión - se movían hacia el electrodo de carga contraria; observó también que las partículas se movían a diferentes-velocidades dependiendo del número de cargas que portaban; a mayor número de cargas mayor velocidad de migració(40,44). Faraday, Humphry Davy y Alejandro Volta establecieron que muchas soluciones acuosas particularmente ácidos, bases y sales, son capaces de conducir - electricidad (20). La conducción eléctrica de estas sustancias (electrolíticas) iban acompañadas de cambios químicos y la cantidad del cambio químico es proporcional a la cantidad de electricidad involucrada.

Las sustancias se clasificaron en electrolitos y no electrolitos de acuerdo a su habilidad en soluciones acuosas de conducir una corriente eléctrica (20).

Aplicación de la Electroforesis al plasma seminal:-

La aplicación de la electroforesis al semen para determinar su composición proteica es relativamente poco frecuente su identificación asume gran importancia siguiendo evidencias de infertilidad (36).

Los estudios electroforéticos generalmente se solicitan para estudios en diversos fluidos corporales (saliva, líquido cefalorraquídeo, suero, orina, etc.) La aplicación de esta técnica a semen comenzó con Roos y G. Miller en 1942 utilizando el aparato diseñado por Tiselius, donde al fotografiar y medir las movilidades por los diferentes picos encontrados de plasma seminal (íntegro, combinado, dializado y fracciones pp. químicamente), y al compararlo con las movilidades del suero sanguíneo observaron que eran similares a las de las albúminas, alfa, beta-globulinas encontrándose además nucleína.

Las pruebas químicas confirmaron la presencia de las glicoproteínas, albúmina y nucleoproteína (16).

Seymour y Huggins utilizando un equipo denominado Longworth (modificación del aparato de Tiselius 1942) mostraron igualmente la presencia de las cuatro principales bandas así como de la misma movilidad electroforética de las alfa, beta, gamma globulinas (aumentándose esta última) y la albúmina, obteniendo además la concentración de cada una de ellas en la proteína total de semen, formando las globu-

linas de 21 a 40% del total de las proteínas.

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS DE LAS CUATRO FRACCIONES

<u>PROTEINAS</u>	<u>%</u>	<u>MOVILIDADES</u>
		<u>U x 10⁻⁵</u>
Albúmina	19.9	6.1
alfa-globulina	21.3	4.3
beta-globulina	39.6	2.7
gamma-globul.	19.1	0.8

La introducción en la electroforesis de un soporte o matriz y no un líquido en los corrimientos de las proteínas, ha desarrollado varias técnicas electroforéticas de identificación de proteínas sobretodo en semen, donde los investigadores han trabajado diferentes técnicas tales como la electroforesis de papel, agar, acetato de celulosa, inmunolectroforesis, electroforesis de disco de gel de difusión, éstas dos últimas se han desarrollado con antisuero humano y con doce proteínas séricas individuales para la identificación específica del semen (16). La electroforesis de plasma seminal en acetato de celulosa da 4 bandas correspondientes a albúmina, alfa, beta y gamma globulinas comparadas con las de suero de sangre. En algunas muestra la banda de la alfa globulina es irregular sugiriendo una alfa-1 y alfa-2 globulinas. El acetato tiene la ventaja de ser rápido su corrimiento utilizando cantidades pequeñas (1 μ lt. además de almace-

narse como evidencia de la presencia de semen en asalto sexual (20, 30, 38).

La inmunolectroforesis en agarosa de plasma seminal produce 15 bandas, las cuales al compararse con las formadas por suero identifican en plasma seminal albúmina, transferrina e inmunoglobulinas. Siendo en la inmunolectroforesis cruzada más amplia la información aquí y donde se identifican de las 14 bandas formadas siete, - previo filtrado sobre sephacryl S-300, obteniéndose proteínas de bajo peso molecular por debajo de los 12 000 D (daltons), las cuales al compararse con las formadas por suero identifican IgA, IgG, transferrina, albúmina, orosomucoide, alfa-antitripsina, fibronectina y lactoferrina. Se ha detectado un factor XIII de la coagulación y una proteína de alto peso molecular, la semenogelina, - siendo las primeras siete proteínas transudadas desde el plasma sanguíneo y las cuatro últimas secretadas por las vesículas seminales (33, 35). La electroforesis en disco produce de 10-18 bandas en plasma seminal que comparadas con suero dan de 14-20; se identificaron: albúmina, beta-globulina y muchas bandas de 5 prealbúminas enfrente de la albúmina de 2-6 en la alfa-1 globulina y de 4-8 en la 2-globulina e inmunoglobulina (36).

Se han tomado patrones de comparación de proteínas de varios fluidos corporales, principalmente las de plasma

sanguíneo, no todas estas proteínas se encuentran en semen pero sí las principales y todos los autores han identificado y coincidido con : Albúmina, globulinas, proteosas, mucina, transferrina y nucleoproteínas entre otras (38,45).

La sofisticación de los métodos electroforéticos ha permitido asimismo la investigación más amplia y una especificidad en las proteínas en su aplicación a líquido seminal en el área Químico Legal es reducida lo que la hace una investigación fragmentada.

Dentro de los marcadores potenciales de semen se encuentran la identificación de la P 30 y la fosfoglucomutasa - (PGM), pero ambas presentan características específicas en el trabajo de laboratorio que las hacen poco acequibles a nivel de rutina pese a su especificidad y como todas las técnicas presentan limitantes cuando existe contaminación ya sea con saliva o incluso un segundo violador que es un punto que aún no se ha salvado completamente aún en las técnicas más específicas en la identificación de líquido seminal (54).

El corrimiento electroforético sobre gel de poliacrilamida y dodecylsulfato de sodio de los péptidos de la P 30 da un marcador específico de semen, ya que esta proteína es específica de él y no se observa en otros fluidos corporales, tales como el suero, saliva, etc. ésta técnica separa las cadenas desnaturalizadas polipeptídicas sobre

las bases de los pesos moleculares de la cadena. Esta técnica posee dos ventajas, una que la detección de las proteínas no depende de la antigenicidad y el no ser antígenos, se pueden detectar y la segunda es que el método evita la vaguedad asociada con la migración de glicoproteínas en el electroforesis convencional.

Esta proteína está presente aún en individuos vasectomizados y su detección en vagina por ser estable al medio vaginal, se detecta aún en trazas diluc. 1:2000, parece ser muy importante en la determinación de semen en asaltos sexuales, sólo que es una técnica que requiere de un esquema de purificación de varias etapas llevándose a cabo a 4° C detectándose con antisuero P 30 y personal bastante capacitado. (47).

Otro marcador genético conocido de estar presente en semen humano, es la fosfoglucomutasa primer locus (PGM_1) sistema más lejano para ser usado en el análisis de evidencia de semen sin embargo también es buen discriminante potencial, ya que los niveles de la actividad de la enzima en semen es alta aún en material diluido tal como fluido vaginal de personas violadas o de manchas extrañas débiles de líquido seminal; algunos laboratorios efectúan la tipificación de PGM_1 como evidencia de semen, llevándose a cabo la tipificación e interpretación por investigadores experimentados de acuerdo a estándares estrictos de patrones claros.

Ya se ha prestado a confusión la apariencia de la isoenzima seminal PGM_1 con el patrón típico de la célula roja en el número e intensidad de las bandas de la isoenzima(54). Estos trabajos no solo se llevan a cabo en gel de poliacrilamida con dodecylsulfato de sodio como soporte, sino aún más sofisticadamente en geles de agarosa y poliacrilamida ultradelgadas determinando el foco o región - isoelectrico de las proteínas dando bandas en forma de cuña siendo muy específicas las determinaciones (54).

Otros métodos menos avanzados en la identificación de líquido seminal determina la presencia de fosfatasa ácida prostática, enzima que se ha trabajado más comunmente.

ELECTROFORESIS DE ZONA.

En esta técnica se colocan las muestras del líquido biológico en el origen y separadas por electroforesis durante "n" minutos (lo estandarizado para el tipo de líquido biológico) en un medio amortiguador alcalino.

Posteriormente se tiñen tiras para la búsqueda de proteína y se determinan en un densitómetro, en el cual la tira teñida se pasa a través de un haz de luz (slit). La absorción debida a las concentraciones proteicas diferentes es detectada por una celda fotoeléctrica y presentada por un registrador en forma de bandas características. (Ver fig. 1).

La separación convierte la configuración de la banda proteica en picos y permite la determinación cuantitativa de los principales picos. (que para líquido seminal son: albúmina, alfa, beta y gamma globulinas).

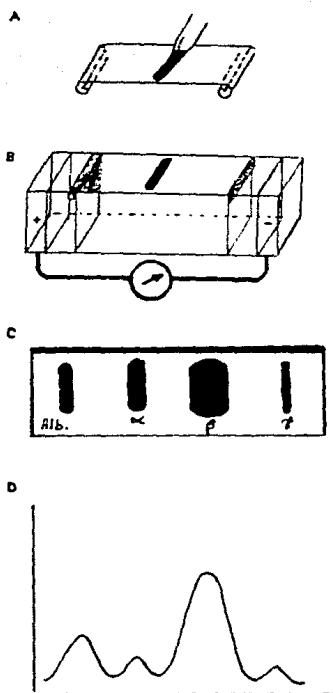


Fig.1 . Técnica de electroforesis de microzona en acetato de celulosa
 A: una pequeña cantidad de líquido seminal es aplicada a una tira de acetato de celulosa. B: se efectúa la electroforesis en un amortiguador de electrolitos. C: Se visualiza la separación de las bandas proteicas en su posición característica con previo procedimiento de tñido. D. Electroforegrama.

ANALISIS ENZIMATICO DE LIQUIDO SEMINAL.

La palabra fosfatasa es usada para describir a la enzima, que cataliza la hidrólisis de compuestos de ácido ortofosfórico. Dependiendo de la especificidad de fosfatasa individuales para diferentes tipos de enlace de grupos fosforilados, son clasificadas como fosfomonoesterasas, fosfodiesterasas (e.g. ribonucleasa, dioxiribonucleasa o lípido fosfohidrolasa) e hidrolasas de anhídrido fosfórico (ATPasas, pirofosfatasa inorgánicas y pirofosfatasa nucleótidas). La actividad de la fosfatasa fué primeramente observada en 1907 en cascarilla de arroz en la cual la enzima actúa desde el ácido fosfórico.

Entre 1908 y 1912 la misma enzima fué mostrada al estar presente en tejido animal como hueso, riñón, bazo y páncreas. Ahora parece que las fosfatasa están presentes en prácticamente todo el material viviente, hueso, plasma sanguíneo, eritrocitos, leucocitos, hígado, riñón, así como algunos productos como: leche, arroz, saliva, café, té, jugo de naranja, de limón; y productos biológicos como: las heces fecales, orina, meconio, etc. (28,1).

Las fosfatasa están involucradas en la síntesis de carbohidratos nucleótidos y en el metabolismo fosfolipídico así como en la formación del hueso (51) .

La mayoría de estos tejidos contienen dos o más isoenzimas. Se ha publicado en la literatura la existencia como

mínimo de seis isoenzimas genéticamente determinadas en eritrocitos. El tejido prostático contiene dos fosfatasa^s ácidas fundamentales que tienen pH óptimos de actividad siendo igualmente los mismos sustratos y los inhibidores específicos para ambos. En suero sanguíneo hay dos fracciones enzimáticas fundamentales, una de ellas es idéntica a la prostática y está caracterizada por la inhibición \pm que sobre su actividad determina el tartrato (41,51).

Las fosfatasa^s ácidas tienen una curva de relación entre actividad y pH bastante plana en la zona situada entre un pH de 4 y un pH de 7 siendo medidas las reacciones en que intervienen a un pH comprendido entre 4.8-6.0, siendo el óptimo para la fosfatasa ácida prostática de aproximadamente 5.0.

HIDROLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática da lugar a la ruptura del enlace O-P. El mecanismo de acción de las fosfomonoesterasas fué reportado en 1952. El rompimiento de fosfomonoésteres por fosfomono^{no}esterasas en agua (ver fig. 2) es acompañada por la incorporación de O- dentro del ortofosfato liberado. Por lo tanto, la hidrólisis de ésteres del ácido fosfórico por fosfomonoesterasas resulta en el rompimiento del enlace O-P en mayor proporción que el enlace C-O. Cuando la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli* es incubada con p-nitrofenilfosfato (marcado con fósforo 32), la enzima va

a atacar covalentemente al grupo fosfato. En una hidrólisis ácida de la enzima, la fosfoserina y los péptidos de la fosfoserina son aislados, hasta aquí parece que el aminoácido serina es involucrado en el sitio activo (24).

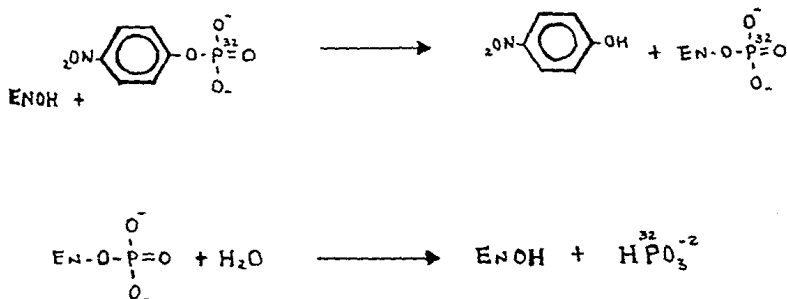


Fig. 2 Hidrólisis enzimática y formación del complejo E-S.

EN= Enzima.

Diferentes sustratos para la determinación de fosfatasa ácida.

La actividad de la fosfatasa ácida fué demostrada por vez primera en 1938 utilizando como sustrato el fenilfosfato sobre el cual tiene de 2 a 3 veces mayor velocidad hidrolítica que sobre el beta-glicerolfosfato. La medida con p-nitrofenilfosfato como sustrato para medir la actividad de la fosfatasa ácida también tuvo éxito, más tarde se introdujo el alfa naftil-fosfato como sustrato específico para fosfatasa ácida prostática, formando el naftol con la O-dianisidina tetraazotizada midiendo un azocolorante, como resultado de la hidrólisis, se mide el color del naftol liberado mediante el uso de un espectrofluorómetro.

Se han incorporado a los sistemas analíticos iones de tartrato o cobre para diferenciar a la enzima fosfatasa ácida de origen prostático de las eritrocitarias, aunque Abul-Fadl y King encontraron que la enzima prostática era inhibida por el tartrato, el fluoruro y el hierro, encontrándose que el formaldehído y el ión cobre por el contrario inhibían a la enzima eritrocitaria. Se ha encontrado además que el sacarato y el oxalato también inhiben a la enzima prostática(51).

La comparación de las actividades relativas de muchos tipos de isoenzimas de fosfatasa ácida humana frente a varios sustratos como son: fenilfosfato, betaglicerofosfato,

y timolftaleína-fosfato) indican que la timolftaleína fosfato es el sustrato más específico para la enzima prostática. Especificidad confirmada cuando se midió la actividad de la (FA) en suero antes y después de la prostatectomía siendo los valores equivalentes a los valores inhibidos por el tartrato cuando se utilizan otros sustratos.

DETERMINACION DE LA FOSFATASA ACIDA SEMINAL.

La fosfatasa ácida (FA) está presente en grandes cantidades en el semen humano (Gutman and Gutman 1941). La isoenzima fosfatasa ácida prostática es sintetizada por las células epiteliales de la glándula prostática y es secretada principalmente en el fluido seminal - extendiéndose algunas veces hasta la orina. La determinación de su presencia es usada como una prueba inicial para la determinación de semen generalmente en investigaciones que involucran asaltos sexuales cuando se encuentra en exudados o lavados vaginales así como en las prendas de la víctima (2).

La fosfatasa ácida es ubicua en la naturaleza (2,3) sin embargo las FA de origen no prostático pueden contribuir a que se alteren los resultados en un acto delictuoso como el asalto sexual donde la búsqueda de fosfatasa ácida en ausencia de espermatozoides es una prueba para detectar semen. Se ha encontrado que la vagina secreta FA (2), esto aún en mujeres inactivas sexualmente, así como en exudados vaginales de mujeres con patologías vaginales de diferente etiología o en fase de menstruación, claro que los niveles son en las primeras y últimas fases de 20 U. Sigma y levemente elevadas en las de vaginitis (7) comparadas con los valores de la

fosfatasa ácida prostática en exudados vaginales post-coitales o de líquido seminal (32).

La falta de un sustrato aparentemente específico o inhibidor de análisis enzimático de la fosfatasa ácida prostática y el decremento de la actividad catalítica en intervalo de tiempo ha hecho que se utilicen varias técnicas para la identificación y sensibilidad de la FAP en base a su presencia por la intensidad del color como el método más comúnmente empleado en el laboratorio químico forense donde se prueba un extracto de la muestra sospechosa con una solución de fosfato sódico alfa-naftil (sustrato) y brentamina azul B last o negro K como reactivo de acoplamiento (Kind 1964) (2). Observándose un rango aproximado de la cantidad de la actividad siendo la prueba cualitativa y no cuantitativa (7). Otros métodos más sensibles han sido el medir el nivel de la actividad de un exudado vaginal después de un intercurso y sin él con fosfato p-nitrofenil (Davies 1978) y ha demostrado que los exudados vaginales sin intercurso sexual (carentes de semen) presentan un nivel de actividad menor a las 20 unidades sigma (20 mol. de nitrofenol liberados por hora (2). Se predice que en los exudados con actividad de fosfatasa ácida menor a las 20 U.S. se incrementa con el tiempo después de un contacto sexual (7).

Se ha utilizado también para medir la actividad de la FAP, la timoftaleína sódica monofosfatada, liberando timoftaleína, siendo también una prueba cuantitativa.

Se ha desarrollado un ensayo inmunológico para la FAP, midiendo su actividad inmunológica y que las distingue de otras fosfatasas ácidas

por sus características antigénicas (7). utilizándo las propiedades inmunológicas de FAP tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo enzimático para medir los niveles enzimáticos en fluidos biológicos. Se ha visto que para investigaciones forenses el ensayo enzimático con p-nitrofenilfosfato como sustrato comparado con RIA muestra datos de - especificidad y sensibilidad comparados y validados anteriormente (32).

La aplicación de la electroforesis para determinar fosfatasa ácida y diferenciarla de otras fosfatasas ácidas también ha sido de gran importancia aportando resultados que coadyuvan a su identificación.

En la determinación de la fosfatasa ácida por electroforesis sobre gel de acrilamida se ha encontrado que las distintas fosfatasas tales como la de los vegetales, zanahoria, hongos, lechuga y distintos fluidos biológicos como la secreción vaginal, bucal, semen de cabra, de cerdo, secreción nasal, sangre menstrual, etc. tienen diferente movilidad electroforética con respecto a la prostática (7,4).

También se ha reportado que la estabilidad de la enzima en muestras de semen de 9 a 12 meses de tiempo (4).

Cuando se aplica la electroforesis determinando el punto isoeléctrico de la enzima con gradiente de pH de 5 a 7 en presencia de alfa-naftilfosfato y sal de negro K se ha podido separar la fosfatasa prostática de mezclas de semen y flujo vaginal, haciendo una diferenciación entre la fosfatasa ácida prostática y la fosfatasa ácida que se encuentra en vagina y materia fecal (4). Por último la utilización de un sistema electroforético multienzimático sobre gel de agarosa, permite la identificación simultánea de fosfatasa ácida, -

fosfatasa alcalina, Deshidrogenasa láctica y amilasa. La identificación indirecta de la DHL permite asegurar la existencia de espermatozoides lisados ya que es abundante en ellos la amilasa para descartar contaminación con saliva y evitar resultados falsos con fosfoglucomutasa. Se reveló también con NAD y ác. láctico, la LDH y la amilasa se identificaron con Gram y Lugol, esto con el objeto de disminuir la posibilidad de dar resultados falsos positivos o verdaderos negativos (44).

I.3.8. OTRAS TECNICAS DE INVESTIGACION DE LIQUIDO SEMINAL.

AMINOPEPTIDASAS:- (Por estudio de las aminopeptidasas seminales).

Para la identificación de las aminopeptidasas del semen, se clasifican en: gammaglutamiltanspeptidasa, leucinaminopeptidasa y cisteaminopeptidasa, utilizándose más relativamente la gammaglutamiltanspeptidasa.

La gammaglutamiltanspeptidasa (GTP) reacciona con la gamma-glutamiltansbeta-naftilamida y p-dimetil-amino-cianobenzaldehído que desarrolla color midiéndose espectrofotométricamente. Se han reportado valores de 4292.37 UI/L en semen fresco, en fluido vaginal de 10.4 UI/L, en orina de 32.31 UI/L, leche materna de 1763.04 UI/L y en saliva de 5.35 UI/L entre otras determinaciones.

COLINA:-

Para la determinación de colina existen varias técnicas como:

- a) La Prueba de florence que detecta la presencia de colina, en concentraciones elevadas en el semen dando como resultado positivo - la formación de agujas de peryoduro de colina.
- b) Con el uso de la cromatografía en capa fina que determina la colina por el reactivo de Hendrich (ferrocianuro de potasio y cloruro de cobalto) como revelador y HCl 1N en la fase móvil, calculando el Rf de aproximadamente 0.55.
- c) Con el uso también de la fluorometría enzimática al reaccionar la colinoxidasa sobre la colina y el peróxido producido junto con él ácido homovállico da un compuesto fluorescente, obteniéndose resultados de 29.5 μ i/ml en muestras hasta de 50 días.

AMINOOXIDASA:-

Con la técnica de identificación de aminooxidasas, se pueden detectar muestras positivas de semen seco de hasta 23 años de impregnación de la mancha conservadas a temperatura ambiente. La técnica se basa en la producción de peróxido por la acción de la oxidasa sobre la colina, en donde el peróxido de hidrógeno reacciona con el N-etil -N (3-metil-fenil)N-acetil etilendiamina y la 4-aminoantipiridina, produciendo un color púrpura (4).

DETECCION DE SUSTANCIAS QUE CONSTITUYEN LOS GRUPOS SANGUINEOS.

Después de identificar como semen una mancha, podrá investigarse en la misma la presencia de sustancias generadoras de los grupos sanguíneos A, B o H. Las personas que generan estos grupos en las muestras mencionadas se les clasifica como secretoras o no secretoras, lo que ayuda a excluir en un determinado porcentaje en los casos de violación. (51).

PRUEBA DE LAS PRECIPITINAS.-

Esta prueba es específica del semen humano teniendo su principal utilidad en la identificación de las manchas de semen. La prueba requiere un antisuero específico obtenido mediante la inmunización de animales adecuados con semen humano y absorción de los antisueros específicos con suero humano. Se realiza del mismo modo que una reacción de precipitinas en un tubo capilar, cubriendo el antisuero con lavados de la mancha.

También es usado como técnica alternativa la aplicación de ultrasonido para separar espermatozoides de ropa, etc.

II.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que en México no se aplican técnicas de laboratorio que sean sensibles y que apoyen la identificación del líquido seminal en el caso de asalto sexual y que sólo un bajo porcentaje se comprueban como tal, alrededor del 10% de los casos (8), surge el interés de investigar nuevas técnicas para cualificar y cuantificar proteínas seminales; como es el caso de la técnica Inmunoenzimática EMIT y la electroforética con membrana de acetato de celulosa que detectan e identifican más específicamente la presencia de líquido seminal en la muestra problema en cuestión.

Además se aplican los resultados obtenidos de las técnicas arriba mencionadas con el uso de la reacción de orientación de color que detecta la presencia de actividad de la enzima FA (8), siendo un aspecto netamente cualitativo observando un desarrollo de color.

Es importante considerar que hasta el momento se ha realizado poca investigación en nuestro país al respecto, la cual no proporciona aún, conclusiones concretas, por tal motivo se estima de utilidad la realización del presente trabajo.

II.2. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Estudio preliminar para demostrar la correlación entre la concentración de proteínas sseminales, actividad de la fosfatasa ácida prostática contra la edad en individuos que habitan la Zona Metropolitana.

Objetivos Específicos:

- 1) Estandarizar la técnica enzimática con p-nitrofenilfosfato para la determinación colorimétrica de la PAP en líquido seminal fresco y muestras de manchas secas en soporte sólido¹.
- 2) Estandarizar la técnica enzimática mediante el método de EMIT con monofosfato sódico de timolftaleína para la determinación de la PAP en líquido seminal fresco y muestras de manchas secas en soporte sólido. (Método Inmunoquímico EMIT).
- 3) Correlacionar los valores obtenidos por las dos técnicas anteriores para medir la actividad enzimática de la PAP.
- 4) Determinar electroforéticamente el porcentaje de proteínas seminales de líquido seminal fresco y muestras de manchas secas en soporte sólido.

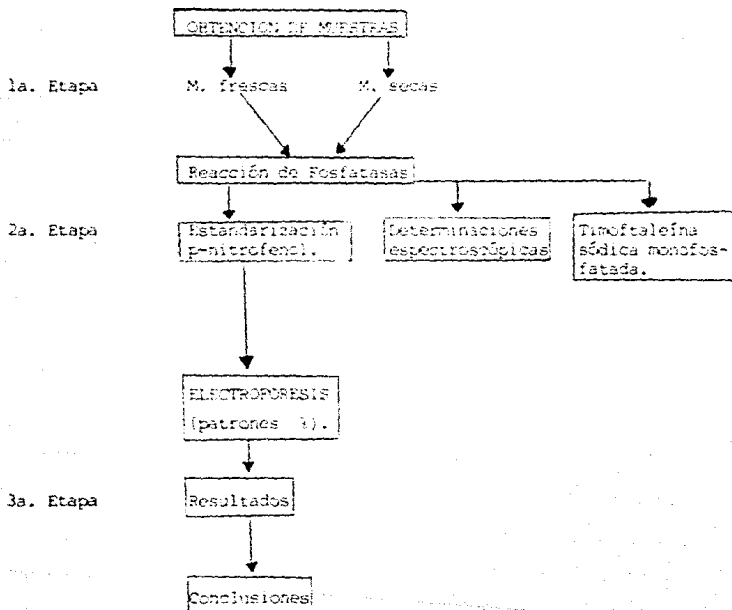
¹Tela, gasa, frotis vaginales (portaobjetos).

II.3 HIPOTESIS DE TRABAJO.

Se ha observado que en el metabolismo del ser humano se efectúan cambios conforme avanza la edad, por lo que se han reportado valores promedio de niños, adultos, neonatos, recién nacidos, ancianos especificando el período de la edad para el cual se indique o se de referencia.

En el caso específico de enzimas y proteínas seminales se cree - que se observará algo similar por lo que en el estudio presente se medirá la actividad enzimática de una proteína seminal - (PAP) en muestras a diferente período de edad y se analizará la variabilidad en los resultados con respecto a la edad.

CAPITULO III.

III.1 ESQUEMA GENERAL DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.PROTOCOLO DEL PLAN DE TRABAJO.

III.1. FASES DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

A. ETAPA DE MUESTREO.

A.1 Fase I. Electroforética.

A.2 Fase II. Colorimétrica.

A.3 Fase III. EMIT.

III.1.1. TIPO Y FUNDAMENTACION DEL MUESTREO.

En el presente trabajo se manejaron dos poblaciones, una de muestras frescas de líquido seminal de 8 a 96 horas de eyaculadas y la otra de muestras secas de una antigüedad que va de 1 a 6 años de exudados vaginales obtenidas de delitos sexuales conservadas en el Laboratorio de Química forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal en condiciones normales para su estudio y posterior confrontación, en cuanto a composición proteica y actividad enzimática FAP.

ETAPA DE MUESTREO:

Para todo trabajo experimental es imprescindible y de indiscutible importancia el papel que tiene un adecuado y bien delimitado muestreo de la población que se pretende estudiar. Por lo que antes de seleccionar las fases en las que se desglosa el trabajo experimental del presente trabajo, se ubicará como primer renglón el MUESTREO.

Se obtuvieron muestra de 60 pacientes entre los 18 y 60 años, de 50-110 kg. de peso y de 1.50 a 1.90m. de estatura, que habitan en la Zona Metropolitana, los que se analizaron por colorimetría y electroforesis para determinar la actividad enzimática de FAP y % de proteínas seminales. (Individuos que residen en la Cd. de México).

Se tuvo acceso a un grupo de 66 muestras de manchas secas sobre soporte sólido (portaobjetos y tela) procedentes de exudados, frotis y prendas pertenecientes víctima de un presunto delito sexual, que fueron conservadas en el laboratorio de Química forense de la P.G.J.D.F. del año 1985 a 1990, las cuales fueron estudiadas por colorimetría y electroforesis, para los propósitos ya señalados.

Un tercer grupo de 65 pacientes fueron muestreados y tomados exudados vaginales propios de Papanicolaou a los que fueron estudiados por colorimetría.

Notas:

- 1) La muestra seca se consideró después de pasada una hora de impregnación con líquido seminal a un soporte (*).
- 2) Las muestras de líquido seminal fueron obtenidas de los Laboratorios de: Pruebas especiales y Hormonas del Hospital 20 de Noviembre; Lab. del Hospital de México y Hospital López Mateos de la Cd. de Méx.
- 3) Papanicolaou muestra de exudado vaginal que no contiene células espermáticas, ni eritrocíticas que pueden interferir con el estudio enzimático y colorimétrico. (Posibilidad de un falso positivo).
Abstinencia de 4 días como mínimo.

(*) Las muestras se obtuvieron impregnando una fracción de tela con semen fresco. Estas telas se guardaron en condiciones anhidras (libres de humedad) desde 1985.

Las muestras secas sobre soporte sólido se fijaron con una dilución 1: 100.

III.1.2. FASE ELECTROFORETICA.

Las muestras obtenidas en la etapa anterior se estudiaron por la técnica de Electroforesis en acetato de celulosa para obtener el porcentaje de proteínas seminales en las dos poblaciones en estudio.

III.1.3. FASE COLORIMETRICA.

Las muestras obtenidas en la etapa anterior se estudiaron también por la técnica de p-nitrofenilfosfato para medir la actividad enzimática de la FAP total en las dos poblaciones en estudio.

III.1.4. FASE EMIT. (INMUNOENZIMATICA).

Las muestras obtenidas en el Muestreo se estudiaron a su vez por la técnica de monofosfato sódico de timolftaleína para medir la actividad enzimática de la FA total en las dos poblaciones en estudio, utilizando la técnica Inmunoenzimática (EMIT).

III.2.0. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

III.2.1. MATERIALES.

Vasos de precipitados: 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml.

Matraces Erlenmeyer: 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml.

Embudos de vidrio: talle corto y largo de diversos tamaños

Espátulas.

Algodón

Gradillas de 40 tubos y 20 tubos.

Matraces volumétricos : 1000 ml, 500 ml, 200 ml, 100 ml, y 50 ml.

Matraces volumétricos : de 25 y 10 ml.

Papel aluminio.

Papel filtro.

Papel parafilm.

Ferilla de seguridad de hule

Pipetas graduadas de: 10 ml, 5 ml, 2 ml., 0.2 ml., 0.1 ml.

Probetas de 500, 100, 50 y 25 ml.

Probetas de 1000 ml.

Tijeras.

Placas de vidrio de 20 x 10 cm. para soporte de membrana de acetato de celulosa.

Tubos de ensayo de 13x 100 y 15x27 mm.

Pipetas Pasteur

Bulbos de plástico

Pipetas semiautomáticas de 20 y 50 μ L

Puntillas para pipeta semiautomática.

Pinzas.

Hisopos de algodón

Aplicadores de madera

Termómetro de -10 a 20C : C

Papel Helena Laboratories para uso en densitómetro (graficador de proteínas).

III.2.2. EQUIPOS.

Cámara de Electroforesis Gelman Sciences de Luxe Electrophoresis
Ohmler.

Fuente de Poder para la cámara de electroforesis P S 500 (Regulated
Power Supply.

Microscopio Comparativo American Optical Corporation (AO) Spencer
Bifocal.

Espectrómetro S-111 SYVA con Vacuum Receiver 10 AMP.

SYVA LAB PROCESSOR COMP. 650C (computadora).

Baño María con parrilla B.G. B.M. 40T, 230 W. 127 V.

DU-7 Spectrophotometer Beckman made in USA con graficador.

Refrigerador Fisher Scientific Isotherm^{tw} - Laboratory Refrigerator
Mod. 3486.

Estufa Fisher Scientific Isotherma oven Mode. 6556.

Centrifuga Beckman made in USA Model. T.J.-6 .

Potenciómetro. Pni tips

Cronómetro De Luxe.

Balanza Analítica Mettler H.80

Densitómetro Helena Laboratories.

Puentes para Cámara de Electroforesis. Marca Gelman Sciences.

Cámaras de Revelado. Marca Gelman Sciences.

Aplicadores de Muestra de 4 y 8 pozos de Gelman Sciences. (Seprapeck
marca Gelman Sciences.)

III.2.3. REACTIVOS . (Y Equipos de Diagnóstico).

Kit para determinación cuantitativa de fosfatasa ácida prostática de Eagle Diagnostics.

Super Sepraphore (Myler Supported Cellulosic Electrophoresis media)

Gelman Sciences. No. 51040 de 5.7x 14.4 cm. (Membranas de Acetato Celulosa).

Sepra clear^{tn} II. Cellulose Acetate clearing solution. No. 51283. Gelman Sciences. (Solución aclarante).

Agua destilada y bidestilada. Laboratorios Sigma.

Acido clorhídrico 0.1 N. Sol volumétrica Art. 9060 Lab. Sigma.

Hidróxido de Sodio 0.1 N. Sol. volumétrica art. 9141. Lab. Sigma.

Etanol absoluto. Merck

Acido acético. Merck

Acido acético. Baker.

Solución de Rojo de Ponceau. Sigma laboratories

Buffer de alta resolución de tris-barbital-barbital sódico pH=8.8

Gelman Sciences pH=8.8 Prod. No. 51104.

p-nitrofenilfosfato cristalizado. Merck. Sol disódica fco=15 grs.

Amortiguador ácido de ácido cítrico pH=4.8

Anaranjado de metilo. Sigma.

p-nitrofenol. Sigma.

Tiras papel pH rango de 0 al 14. Merck.

alfa-naftil fosfato sódico . Sigma .

Solución NaCl 0.85%. Travenol.

Azul de Metileno. Sigma.

SOLUCIONES.- (PREPARACION Y RECOMENDACIONES).

1).- Substrato:Fosfato de p-nitrofenilo.

Se disuelven 100 mgs. en 25 ml. de agua destilada.

*) Para una mejor conservación se combina con amortiguador. pH=4.8

Consiste en mezclar volúmenes iguales de amortiguador ácido y solución de sustrato y pasar volúmenes de 2.0 ml y conservarlos en congelación. (para su conservación y uso).

**Es absolutamente necesaria la pureza de fosfato de p-nitrofenil fosfato.

2).- Patrón concentrado de p-nitrofenol 10 milimoles por litro.

Disolver 1.3911 g. de p-nitrofenol, grado analítico,

($\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$) en agua recién destilada y se afora a un litro.

Se conserva un año en el refrigerador. (Esta disolución permanece estable bajo condiciones de refrigeración (2-8 C).

3).- Solución patrón diluida. (de p-nitrofenol).

1.0 ml de patrón concentrado se afora a 200 ml. con NaOH 0.02 N

Se mezcla cuidadosamente y la parte no utilizada se deshecha.

Debe prepararse nuevo para construir la curva de calibración.

4).- Hidróxido de sodio 0.02 N.

Conservar en envase de plástico.

5).- Amortiguador ácido de pH 4.8. (De citrato).

Disolver 18.907 g de ácido cítrico de grado analítico

$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 180 ml. de NaOH 0.1 N. Añadir 100 ml. de HCl 0.1 N. Mezclar y verificar el pH con un potenciómetro; debe ser 4.8. Añadir algunas gotas de cloroformo como conservador y colocarlo en envase de plástico en el refrigerador.

6).- Hidróxido de Sodio 0.1 N.

Diluir 100 ml. de NaOH 1N, cuidadosamente titulada, hasta un litro con agua destilada. Conservar en frasco de plástico.

III.3. TÉCNICAS EMPLEADAS.-

III.3.1. ELECTROFORESIS.

Se denomina la electroforesis, a la separación de macromoléculas bajo la influencia de un campo eléctrico cuando ésta se lleva a cabo en papel ó acetato de celulosa en la cual las proteínas están separadas casi por completo sobre la base de la carga eléctrica se llama electroforesis de Zona (12).

Así pues, también se denomina como el movimiento o migración de partículas coloidales cargadas, en relación con el disolvente bajo influencia de un campo eléctrico, así como de otros factores como: la forma y tamaño de las partículas presentes y su carga electroforética. Del pH de la solución amortiguadora requerida para el corrimiento, depende la carga de cada partícula coloidal proteica (37).

PROCEDIMIENTO.*

- 1.- Poner la solución amortiguadora en la Cámara de Electroforesis.
- 2.- Remover la membrana de acetato de celulosa de su envase con unas pinzas y sumérgirla lentamente en el amortiguador dejándolo que se humedezca completamente. El amortiguador avanza a lo largo de la membrana hasta que llega al final de ésta, entonces la membrana se introduce totalmente dentro de la solución amortiguadora.

- 3.- Dejarla aproximadamente 10 minutos sumergida en el amortiguador.
- 4.- Con ayuda de pinzas sacar la membrana y se coloca en papel secante. Deberá tenerse precaución especial en este punto para lo cual es importante: **PRECAUCION: SECADO CRITICO.**

No debe dejarse la membrana secar demasiado.

Se deberá deshechar la membrana cuando aparezcan zonas blancas en su superficie y cambiarla por otra nueva.
- 5.- La membrana ya seca, se coloca en el puente de electroforesis y se aplica la muestra con el aplicador especial (Sepratek-4 Applicator).
- 6.- Se coloca la tapa de la cámara en su lugar y se conecta el reloj de tiempo: 20 Minutos. Se aplica el voltaje para el caso: 240 V.
- 7.- Sacar la membrana del tanque y colocarla en un recipiente con colorante Rojo de Ponccau S por 10 minutos deslizándola la membrana con mucho cuidado, formando un pequeño ángulo con la superficie de la solución colorante, de modo que la zona entre los agujeros entre en contacto al mismo tiempo con el colorante.
- 8.- Colocar la membrana en baño de sol. Ac. Acético al 5% por 5 minutos. Lavarla primero con agitación leve y descartar el líquido sobrante. Posteriormente sustituir el volumen de sol. ácida y completar los 5 minutos agitando suavemente.
- 9.- Posteriormente se coloca la membrana en un baño de etanol absoluto por 5 minutos.
- 10.- Antes de pasar la membrana al baño de aclaramiento debe tratarse de que escurra la mayor cantidad posible de la solución del lavado anterior.
- 11.- La membrana se coloca en un baño de aclaramiento usando solución aclaradora (Gelman sciences 51283) por 5 minutos agitando suave-

mente.

- 12.- Transcurrido el tiempo se saca la membrana y es colocada sobre una placa de vidrio pasando un gendarme de goma sobre el acetato húmedo presionando de manera que quite el exceso de solución aclarante, sin modificar las imágenes obtenidas, en uno o dos movimientos.
- 13.- Colocar la placa en la estufa a $T = 80^{\circ} C$ por 15 minutos.
- 14.- Dejar enfriar la placa de vidrio e introducir la membrana en una envoltura de plástico para la lectura fotométrica.
- 15.- Leer la membrana en el densitómetro.
- 16.- Obtener el % de Proteínas del gráfico obtenido en el densitómetro (37).

III.3.2. COLORIMETRIA.

FUNDAMENTO

Las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. La actividad total de la fosfatasa en el líquido seminal a pH=4.8 es medida a través de la cantidad de p-nitrofenol liberado.

Para la determinación de la fosfatasa según Andersch y Szczypinski, se utiliza como sustrato el p-nitrofenilfosfato que por la acción de la enzima libera p-nitrofenol y ácido fosfórico. Añadiendo hidróxido de sodio se interrumpe la reacción y el p-nitrofenol liberado es transformado en el anión de color amarillo, que se determina fotométricamente. La cantidad de p-nitrofenol liberado a la actividad de la enzima PA. (37).

PROCEDIMIENTO:-

Se coloca 1.0 ml. de sustrato y 1.0 ml. de amortiguar ácido en un baño de agua a 37 ° C por 5 minutos. Se adiciona 0.2 ml. de líquido seminal con incubación posterior durante 30 minutos exactamente a - 37 ° C. Añadir 4.0 ml. de NaOH 0.1 N y mezclar por inversión.

Se prepara un blanco de suero mezclando 5.0 ml. de NaOH 0.1 N y 0.2 ml. de líquido seminal.

Se prepara un blanco de igual forma que para el problema con 0.2 ml. de agua destilada.

Leer las absorbancias a 410 nm. estableciendo cero con agua destilada.

CALCULO:

$$\text{Abs. Problema (Abs. Blanco + Abs. Blanco L.S.)} = \text{Absorbancia total de Fosfatasa ácida.}$$

III.3.3. E M I T. (INMUNOENZIMÁTICO).

FUNDAMENTO:

La fosfatasa ácida prostática hidroliza al sustrato sintético monofosfato sódico de timolftaleína liberando timolftaleína. La adición de alcalí termina la reacción enzimática y simultáneamente revela un color azul. La intensidad del color azul medida a 590 nm. es proporcional a la actividad enzimática de la PAP.

TECNICA.

- 1.- Colocar 0.5 ml. de Reactivo concentrado de fosfatasa ácida como sigue: Blanco, Calibrador, Control y Problema.
- 2.- Colocar 0.5 ml. de Diluyente ácido de P. ácida para cada tubo y mezclar bien. (Fosfatasa ácida).
- 3.- Incubar a 37 ° C por 5 minutos.
- 4.- Adicional 0.1 ml. de muestra al problema y mezclar. Usar agua desionizada para el blanco.*
- 5.- Incubar exacta mente 30 minutos a 37° C.
- 6.- Adicionar 1.0 ml. de Revelador de Color y mezclar.
- 7.- Leer las absorancias a 590 nm. ajustando a cero con el blanco, del calibrador, control y muestras problema.

CALCULOS:

$$U/L = \frac{\text{absorbancia del problema}}{\text{absorbancia del calibrador}} \times \text{Concentración del (U/L). Ca librador}$$

Nota * Kit de Eagle Diagnostics.

IV.1 TABULACION Y GRAFICACION DE RESULTADOS OBTENIDOS.

IV.2 "ELECTROFORESIS".

La tabla 1 y las gráficas de la No. 1 a la No. 10 ilustran los resultados obtenidos para las cuatro fracciones proteicas en promedio para:

- *) Fracción albúmina.
- *) Fracción alfa-globulina.
- *) Fracción beta-globulina.
- *) Fracción gamma-globulina.

en el líquido seminal fresco de individuos que habitan la zona metropolitana de la Cd. de México con la cuantificación electroforética de estas proteínas seminales, resultados agrupados con respecto a 5 diferentes intervalos de edad.

La tabla 2 y la gráfica No. 11 ilustran los resultados en líquido seminal en mancha seca sobre soporte sólido.

La tabla 3 y la gráfica 12 ilustran la frecuencia en cuanto al origen de las muestras de líquido seminal, en dos grupos por origen de procedencia de los individuos, si del Distrito Federal o del interior de la República.

IV.3 "COLORIMETRIA".

En la tabla No. 4 y la gráfica No. 13 se observa el promedio de actividad enzimática de FAP en diferentes tipos de muestra a tres rangos diferentes de temperatura.

Congelada= -4°C ; Refrigerada= 2°C y Medio Ambiente= 22°C .

En la tabla 5 y la gráfica 14 se muestra la actividad enzimática de la fosfatasa ácida prostática en los 5 intervalos de edad propuestos para el estudio y para medir la actividad de FAP se utilizó el sustrato p-nitrofenilfosfato.

En la tabla 6 y la gráfica 15 se observa el promedio de la actividad enzimática de FAP medida con p-nitrofenilfosfato como sustrato y el año en el que se almacenó el soporte sólido que fue impregnado con líquido seminal.

Para muestras que provienen del año 1988 se observa una mayor actividad dado que el soporte sólido es una gasa impregnada de líquido seminal en tanto que para el año 1989 se tienen diversos soportes impregnados de exudados vaginales que contuvieron líquido seminal en concentraciones que van desde diluciones 1 a 100 hasta líquido seminal como tal.

En la tabla 7 y la gráfica No. 16 se muestran los 3 distintos tipos de muestras que se utilizaron para medir la actividad de FAP utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato y muestras frescas:- Son de líquido seminal de donadores.

Secos:- Líquido seminal impregnado en un soporte sólido como (gasa, portabjetos y tela entre otros).

Testigos negativos:- Exudados vaginales que no cursaron con relación sexual (Abstinencia de mínimo 4 días) y sin presencia de celularidad eritrocitaria propia de preparación de Papanicolaou.

dicha tabla relaciona los promedios de actividad obtenidos para cada tipo de muestra.

En la tabla No.8 y la Gráfica No. 17 se ilustraron los resultados

de actividad enzimática de la FAP en los 5 intervalos de edad.

En la tabla 9 y 10 y gráficas No. 18 y 19, se observan niveles de FAP con relación al tiempo que duraron guardadas las muestras secas y que se determinó con Timolftaleína sódica y al tipo de muestra en estudio (fresca, seca o control negativo).

IV.2 "ELECTROFORESIS".

Tabla No. 1. "DETERMINACION ELECTROFORÉTICA DEL PORCIENTO DE PROTEINAS EN LIQUIDO SEMINAL DE HABITANTES EN LA ZONA METROPOLITANA".

EDAD (años)	<u>% DE PROTEINAS.</u>			
	Albúmina	<u>globulinas</u>		
		alfa	beta	gamma
20-25	14.14	19.25	48.05	18.72
26-30	26.77	33.81	69.53	12.89
31-35	25.02	23.43	67.19	24.82
36-40	18.83	26.84	46.50	10.57
41-52	16.25	33.08	45.33	5.33

Tabla No. 2 "DETERMINACION ELECTROFORETICA DEL PORCIENTO DE PROTEINAS SEMINALES EN MANCHAS SOBRE SOPORTES SOLIDOS DE LIQUIDO SEMINAL DE 1985 a 1990".

AÑO	<u>% DE PROTEINAS</u>			
	ALBUMINA	GLOBULINAS		
		alfa	beta	gamma
1988	20	5	20	55
1990 ¹	19	26	37	18
1990 ³	16.6	11.11	66.6	5.63
1990 ²	8.33	16.66	43.0	32.0

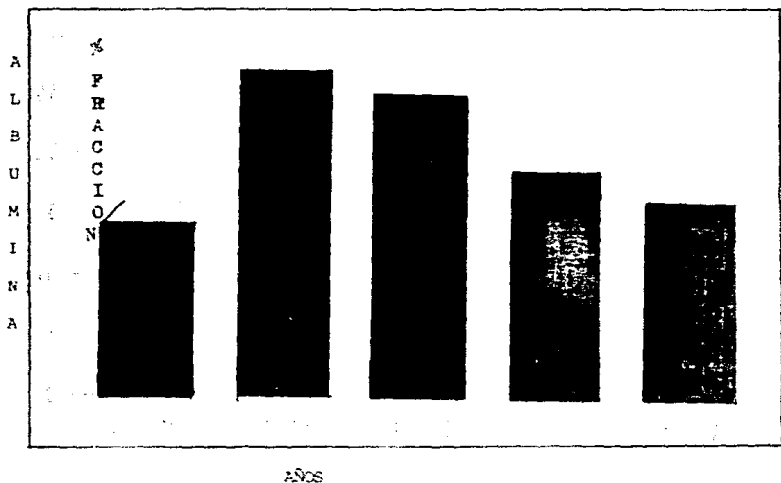
Nota: De los años 1985, 1986, 1987 y 1989 no hubo aparición de bandas en acetato de celulosa, por lo que no existen resultados.

1= al mes de enero de 1990.

2= al mes de febrero de 1990.

3= al mes de marzo de 1990.

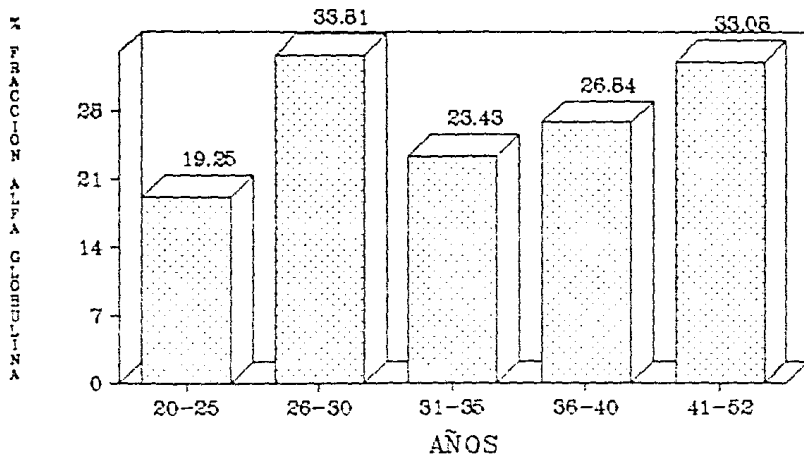
RELACION DE LA FRACCION ALBUMINA
VS EDAD EN MUESTRAS FRESCAS
LIQUIDO SEMINAL



Gráfica No. 1. Porcentaje de la Fracción Albúmina de las Proteínas Seminales, separadas electroforéticamente en membrana de acetato de celulosa.

En esta gráfica se observa un incremento en el % de la albúmina en las muestras de 20-30 años de edad y un mínimo en el intervalo de los 20-25 años de edad.

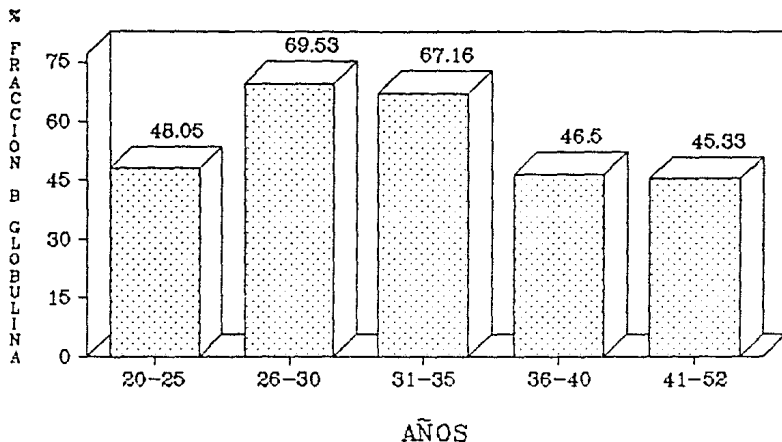
RELACION DE LA ALFA GLOBULINA VS EDAD
EN MUESTRAS DE LIQ. SEMINAL



Gráfica 2. Cuantificación de la fracción alfa globulina a diferentes intervalos de edad. El promedio de cada intervalo se indica sobre cada barra.

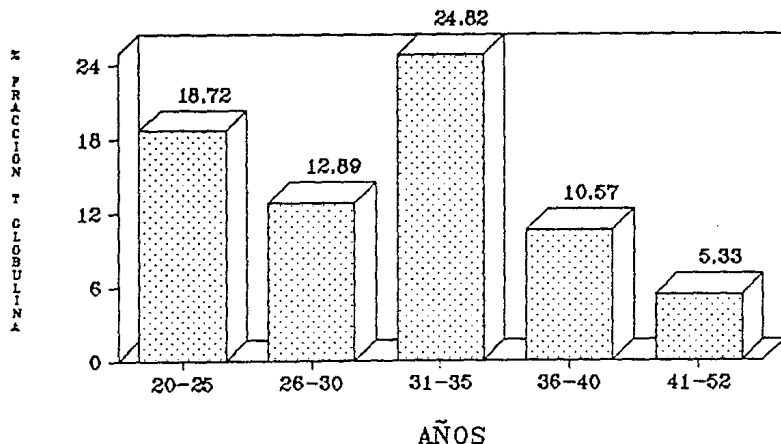
Del intervalo de 26-30 años se observa un incremento del % promedio γ -Glob.

RELACION DE LA BETA GLOBULINA VS EDAD
EN MUESTRAS DE LIQ. SEMINAL



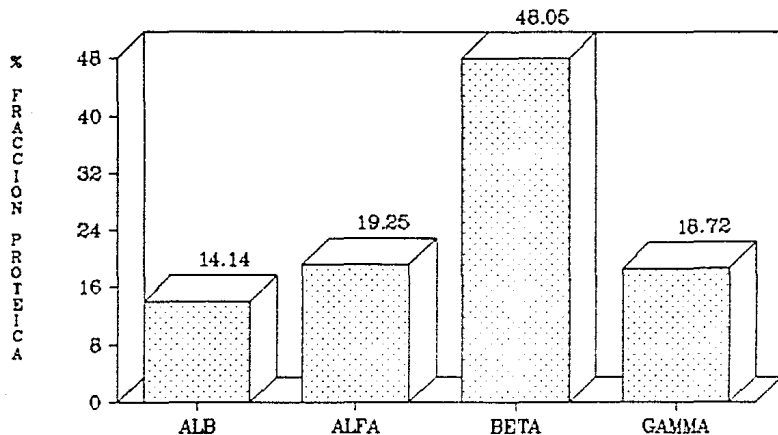
Gráfica 3. Cuantificación de la fracción beta globulina a diferentes intervalos de edad. Los porcentajes de la fracción para cada intervalo se encuentran sobre la barra respectiva. (Del intervalo de 26-30 años se observa un incremento del % promedio para beta globulina.)

RELACION DE LA GAMMA GLOBULINA VS EDAD
EN MUESTRAS DE LIQ. SEMINAL



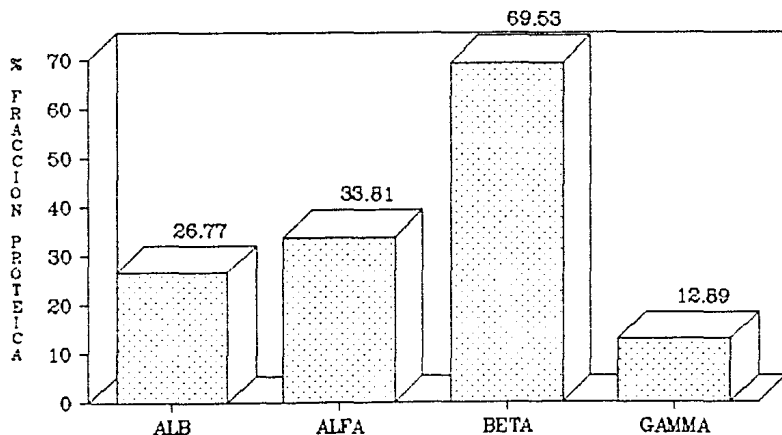
Gráfica 4. Cuantificación de la fracción gamma globulina a diferentes intervalos de edad. El promedio para cada rango se encuentra arriba de la barra respectiva a cada intervalo. En esta gráfica se aprecia un aumento significativo para el 3er. intervalo comprendido entre los 31-35 años.

**% DE PROTEINAS SEMINALES EN
INDIVIDUOS DE 20 A 25 AÑOS
MUESTRA FRESCA**



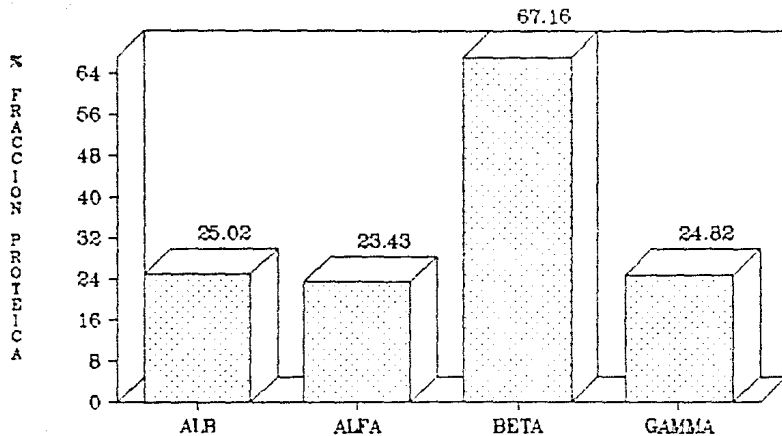
Gráfica No. 5. Promedio del porcentaje de proteínas seminales en individuos de intervalo comprendido entre los 20-25 años en donde se observa un incremento considerable para la fracción beta seguido de la fracción alfa.

**% DE PROTEINAS SEMINALES EN
INDIVIDUOS DE 26 A 30 AÑOS
MUESTRA FRESCA**



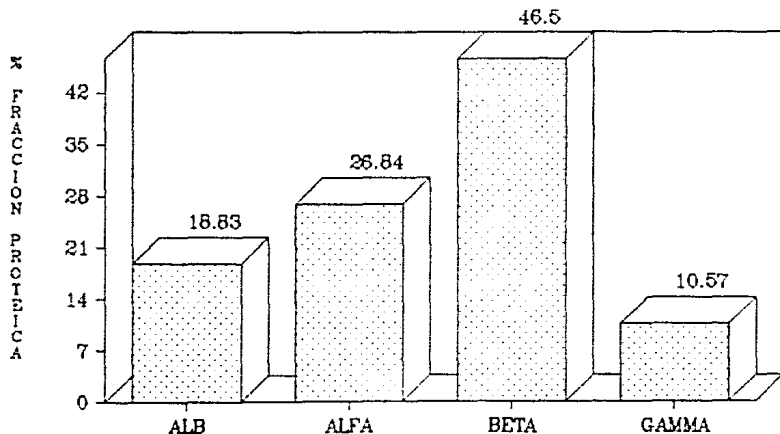
Gráfica 6. Promedio del porcentaje de proteínas seminales en individuos de intervalo comprendido entre los 26 a 30 años. En la gráfica se aprecia un incremento en la fracción beta-globulina de 69.53%.

% DE PROTEINAS SEMINALES EN
INDIVIDUOS DE 31 A 35 ANOS
MUESTRA FRESCA



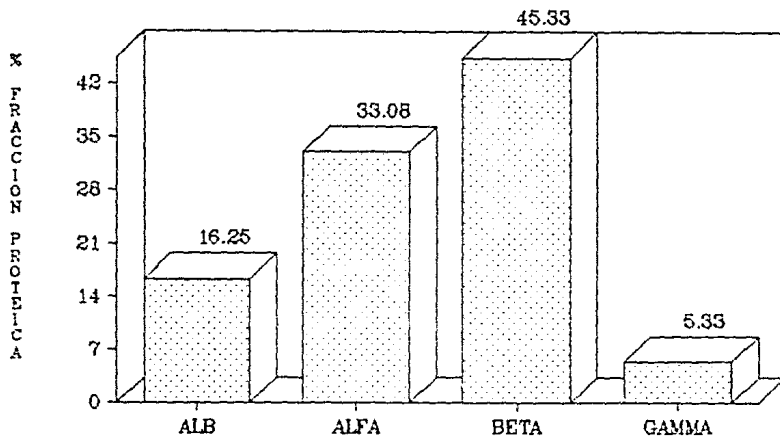
Gráfica No. 7. Datos sobre el % de proteínas seminales en individuos con intervalo comprendido entre los 31-35 años de edad. En la gráfica se observa un incremento en la fracción - beta-globulina.

% DE PROTEINAS SEMINALES EN
INDIVIDUOS DE 36 A 40 AÑOS
MUESTRA FRESCA



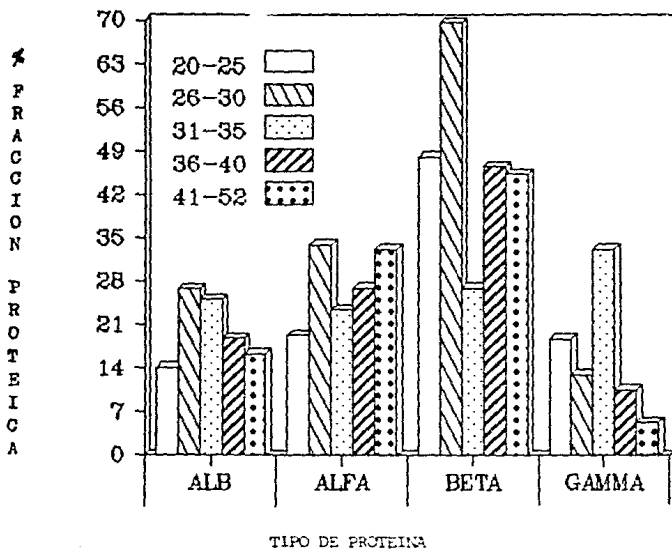
Gráfica No. 8. Promedio del porcentaje de proteínas seminales en las muestras de individuos con intervalo comprendido entre los 36-40 años de edad.

% DE PROTEINAS SEMINALES EN
INDIVIDUOS DE 41 A 52 AÑOS
MUESTRA FRESCA



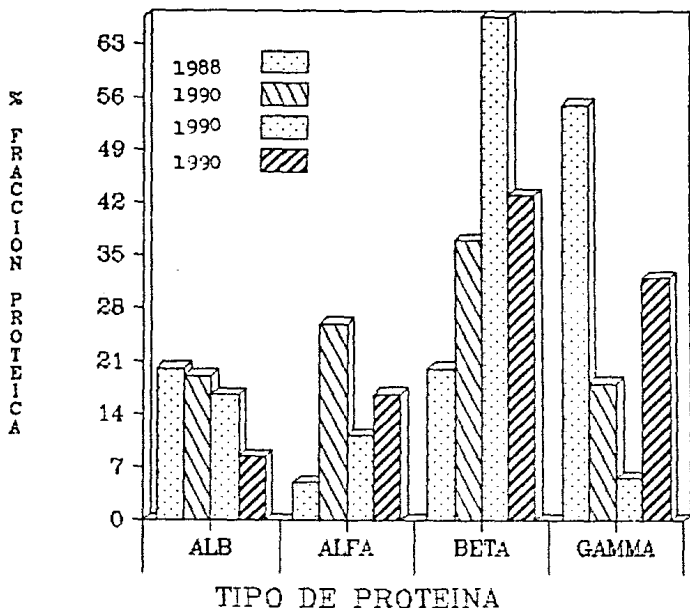
Gráfica 9. Promedio del % de proteínas seminales en LSH fresco en individuos de 41 a 52 años de edad. La fracción beta es la de mayor tamaño (45.33 %).

% DE PROTEINAS SEMINALES VS INTERVALOS DE EDAD EN LIQUIDO SEMINAL FRESCO



Gráfica No. 10. Porcentaje de las cuatro fracciones proteicas separadas por electroforesis del Líquido Seminal fresco, en los 5 intervalos de edad en los que se aplicó el estudio. Observar la concentración sobresaliente de la fracción beta propia del LSH.

% DE PROTEINAS SEMINALES EN MANCHA SECA VS AÑOS



Gráfica 11. Porcentaje de las cuatro fracciones separadas electroforéticamente en el líquido seminal presente en mancha seca sobre soporte sólido. Se observa que se detectó mayor cantidad de proteína a menor tiempo transcurrido a la impregnación del líquido seminal en el soporte.

Tabla No. 3. Frecuencia del origen de los individuos que se muestrearon en el D.F. y en Provincia para la cuantificación electroforética de proteínas seminales.

EDAD (años)	FRECUENCIA	ORIGEN
20-25	7	Distrito Federal
26-30	19	Distrito Federal
	4	Provincia.
31-35	12	Distrito Federal
	7	Provincia
36-40	5	Distrito Federal
	4	Provincia
41-52	1	Distrito Federal
	4	Provincia.

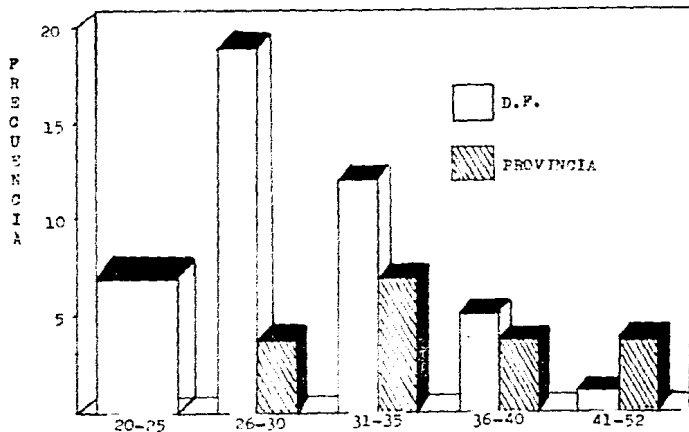
Nota: Provincia estuvo dada por las siguientes entidades:

Guerrero (Textla, Mapa, Acapulco, Xochiara, Chilpan -
cingo).

Toluca y Edo. de Méx.

Veracruz , Chiapas, Guanaquato, Colima Oaxaca, Michoa-
cán y Campeche.

FRECUENCIA DEL ORIGEN DE LOS INDIVIDUOS EN EL MUESTREO DE LA
ZONA METROPOLITANA VS INTERVALO DE EDAD.



Gráfica No. 10. Frecuencia del origen de los individuos que se muestrearon en el D.F. y en Provincia para la cuantificación electroforética de proteínas serúmicas en muestras frescas.

IV. 3. "COLORIMETRIA".

Tabla No. 4 RELACION DEL DATO EN PROMEDIO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CONTRA MUESTRA FRESCA MEDIDA POR LA LA TECNICA DE p-nitrofenilfosfato en UI/L.

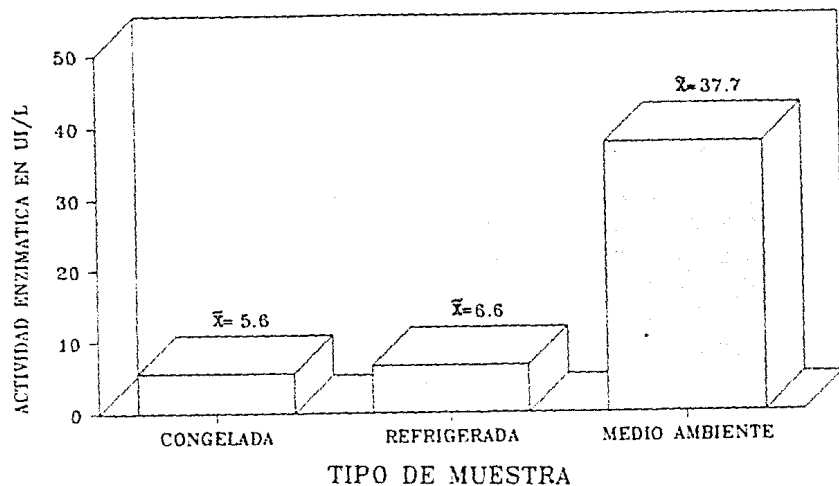
TIPO DE MUESTRA	ACTIVIDAD ENZIMATICA PROMEDIO
CONGELADA	5.6
REFRIGERADA	6.6
MEDIO AMBIENTE	37.7

Nota: El estudio se llevó a cabo, a temperatura ambiente, condición necesaria para evitar la degradación de la enzima FAP y obtener resultados "falsos negativos".

La escala empleada fue en UI/L.

La tabla indica los datos de FAP promedio que presentó la muestra de semen, que se obtuvo por tipo de muestra .

ACTIVIDAD ENZIMATICA VS. TIPO DE MUESTRA FRESCA



Gráfica 13. Actividad de la Fosfatasa ácida prostática medida por la técnica de p-nitrofenilfosfato contra condiciones de preservación de la muestra fresca. Se observa un incremento marcado en muestras al m. ambiente.

Tabla No. 5. Muestra la actividad enzimática de la FAP relacionando la edad en líquido seminal fresco.

INTERVALO EN AÑOS	ACTIVIDAD ENZIMATICA EN UI/L.
20-25	16.15 Promedio
26-30	10.56 "
31-35	10.58 "
36-40	12.0 "
41-52	6.12 "

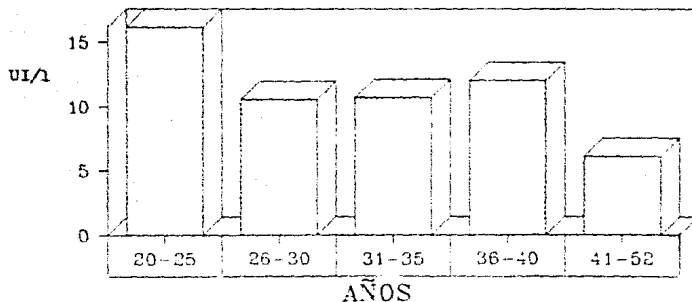
Nota: El promedio de actividad fue estimado usando como sustrato p-nitrofenilfosfato.

Tabla No. 6. Muestra la actividad enzimática promedio de la FAP con el sustrato de p-nitrofenilfosfato para muestras de semen seco y que fueron almacenadas durante los años 1988,1989 y 1990.

AÑO DE ALMACENAMIENTO (ANTIGUEDAD).	PROMEDIO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN UI/L.
1988	30
1989	7.6
1990	13.2

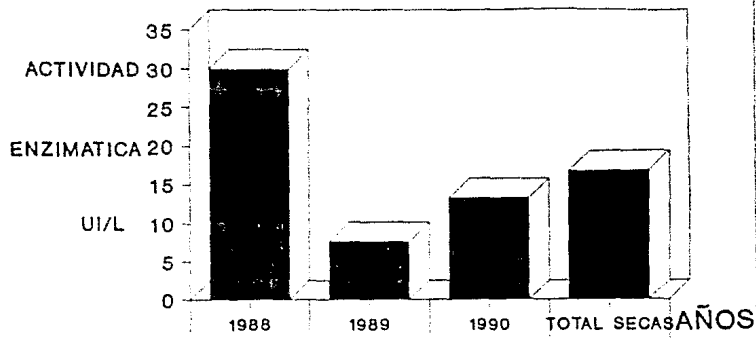
Nota: El año denota el tiempo que tiene la muestra sobre el soporte sólido una vez que se concluyó el estudio de rutina que se efectúa sobre las muestras, se guardaron hasta que se les aplicó el estudio.

ACTIVIDAD ENZIMATICA VS
INTERVALOS DE EDAD EN
LIQUIDO SEMINAL FRESCO



Gráfica 14. Actividad enzimática de la fosfatasa Ácida prostática a 5 diferentes intervalos de edad comprendidos entre los 20 a 52 años. La actividad enzimática se ve incrementada de los 20 -25 años de edad. Para medir la FAP se utilizó como sustrato p-nitrofenilfosfato.

TIPO DE MUESTRA SECA VS AÑOS DE ANTIGUEDAD



Gráfica 15. Actividad enzimática de la fosfatasa ácida prostática en muestras de líquido seminal en mancha seca sobre soporte sólido. Se observa actividad en los años de 1988, 1989 y 1990. La barra correspondiente a 1988 - corresponde a líquido seminal impregnado en gasa y de 1989 y 1990 se muestra para actividad en exudados vaginales de la PAP en portaeobjeto y tela.

Se utilizó p-nitrofenilfosfato como sustrato.

Tabla No. 7 . Actividad de la Fosfatasa ácida prostática relacionada con el tipo de muestra utilizada en el estudio enzimático que fue medida con el sustrato p-nitrofenilfosfato.

TIPO DE MUESTRA	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UI/L.
Fresca	11.3
Seca	16.74
Negativa	1.39

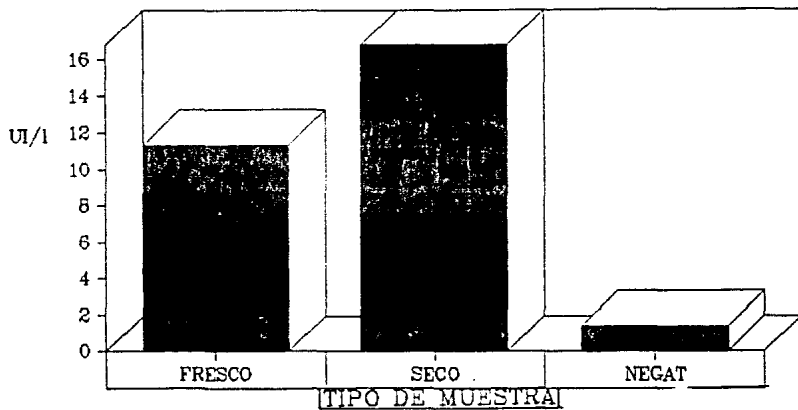
IV. 4. " E M I T "

Tabla No.8. Actividad enzimática de la FAP relacionado con intervalos de edad en Líquido seminal fresco (sustrato=Timolftaleína sódica).

EDAD EN AÑOS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UI/L.
20-25	491.47
26-30	436.11
31-35	278.90
36-40	690.50
41-52	460.30

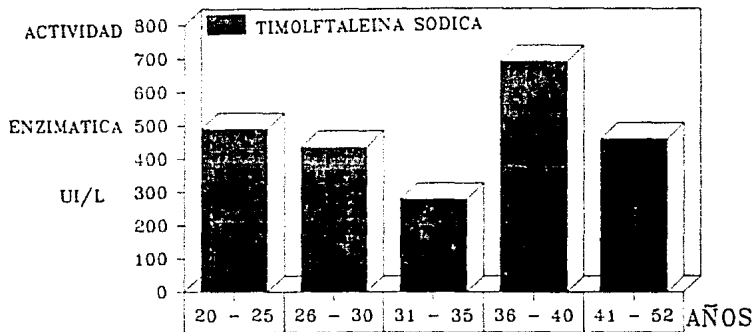
ACTIVIDAD ENZIMATICA VS TIPO DE MUESTRA

p-NITROFENIL FOSFATO (SUBSTRATO)



Gráfica 16. Actividad de la Fosfatasa ácida prostática contra el tipo de muestra utilizada en el estudio medida con el sustrato p-nitrofenilfosfato.

ACTIVIDAD ENZIMATICA VS INTERVALOS DE EDAD EN LIQUIDO SEMINAL FRESCO



Gráfica 17. Actividad enzimática de la fosfatasa ácida prostática en muestras de líquido seminal fresco a diferentes intervalos de edad.

Tabla No.9. Actividad enzimática de la FAP medida con sustrato de Timolftaleína sódica en muestras de mancha seca de semen. (Almacenamiento).

AÑO(en que se almacenó)	ACTIVIDAD ENZIMATICA UI/L.
1988	232
1989	97.16
PROMEDIO SECAS	144

Nota: Después del estudio preliminar rutinario a la muestra se procede a guardarla en una bolsita de plástico cerrada y puesta en un bre con su debida identificación. Estas fueron muestreadas al azar y practicadas las pruebas necesarias para su identificación de proteínas seminales.

Tabla No.10. Promedio de la actividad enzimática de la muestra en UI/L con Timolftaleína sódica como sustrato.

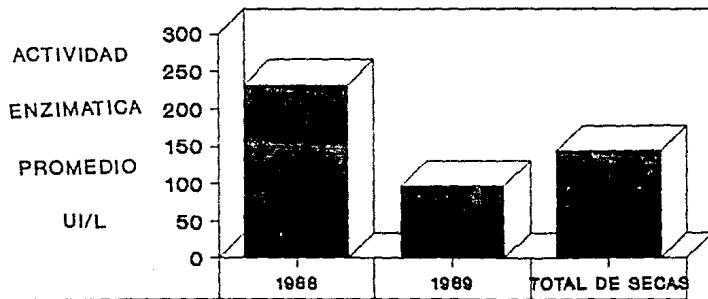
TIPO DE MUESTRA	ACTIVIDAD ENZIMATICA EN UI/L.
Fresco	470
Seco	140
Negativa	20

Nota: Fresco= Líquido seminal.

Seco= Líquido seminal en soporte sólido.

Negativo= Controles de exudados vaginales sin líquido seminal.

ACTIVIDAD ENZIMATICA VS TIPO DE MUESTRA SECA EN AÑOS



Gráfica No.16. Promedio de actividad enzimática para, fosfatasa ácida prostática en mancha seca en soporte sólido. Se cuantificó soportes sólidos de exudados vaginales, usando como sustrato la Timolftaleina sódica expresado en UI/L. Se observa el tiempo que tienen las muestras.

 TIMOLFTALEINA SODICA

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA VS TIPO DE MUESTRA

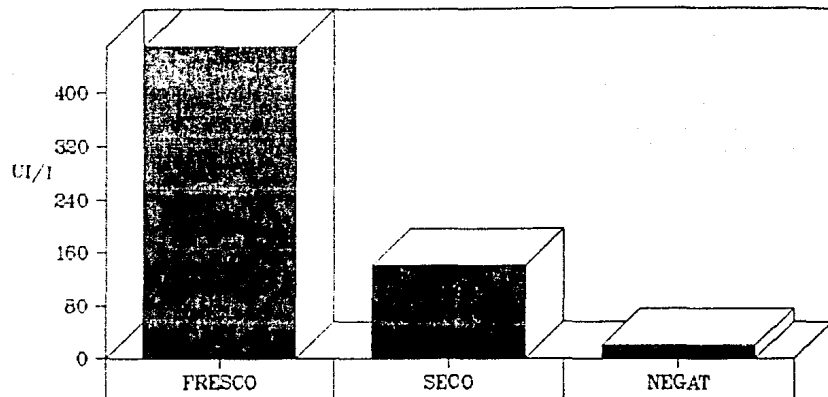


Gráfico 19. Muestra el promedio de actividad enzimática en UI/l con Timolftaleína sódica como sustrato

El tipo negativo, es aquel que no presenta líquido seminal (Promedio= 20 UI/l).

TIMOLFTALEINA SÓDICA (SUBSTRATO)

"ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS".

Del estudio electroforético realizado se observó que las fracciones proteicas identificadas son: albúmina, alfa, beta y gamma globulinas, de acuerdo a la movilidad que presenta en la electroforesis lo que coincide con lo reportado (36,18) no pudiéndose separar otro tipo de proteína por su baja concentración.

Lo anterior demuestra que la técnica electroforética para la identificación de proteínas seminales no obstante que no es de alta resolución, es una técnica muy útil para el estudio de las principales proteínas del líquido seminal constituyéndose en una técnica importante adicional en la identificación del fluido biológico (6,11,16,18,19).

Ahora bien, de los resultados obtenidos, independientemente de la edad, el tipo de muestra u origen de la misma, se observa una constante (ver patrón electroforético): La fracción albúmina es la que se encuentra en la transudación de proteínas convirtiéndose así en un marcador seguro, detectado en acetato de celulosa a diferencia de la Lactoferrina que es el otro marcador, pero que no se puede evidenciar con acetato de celulosa sino con electroforesis de alta resolución (11,36).

De acuerdo con las gráficas analizadas (de 1 a 11) el orden decreciente de las fracciones proteicas presentes, es el siguiente: Beta (69.53) ; alfa (33.81); gamma (33.08); y albúmina (26.77) en promedio lo cual se debe al grado de actividad tisular del órgano que secreta tales proteínas.

Sin embargo, para fines forenses no es tan importante el porcentaje de proteínas, sino su movilidad electroforética, ya que de esta última se pauta para establecer la identidad del líquido seminal y diferenciarlo de otros fluidos corporales, como por ejemplo: suero, saliva, etc. El patrón electroforético obtenido en acetato de celulosa fue constante en todas las muestras analizadas y corresponde a líquido seminal de acuerdo con Gray (11, 18, 19 y 20), realizado en poblaciones anglo-sesones, coincidiendo con el mismo patrón. La importancia de esta investigación electroforética radica también en que fue realizada en población de la Cd. de México, lo cual no se había efectuado antes y demuestra un patrón similar.

De las fracciones proteicas separadas por electroforesis en acetato de celulosa, la correspondiente a las beta globulinas y mayor cantidad presente, es importante para nosotros ya que de acuerdo a la literatura, en ellas se localiza a la Fosfatasa Ácida, lo que implica que como constituyente del semen normal, siempre la identificaremos con la presencia de esta banda y de las demás en conjunto con los resultados cualitativos para la identificación de líquido seminal, ya que la fosfatasa ácida prostática es una enzima específica del líquido seminal que se encuentra en altas concentraciones en el líquido prostático (7, 8, 15, 16, 19, 41, 51), siendo una de las enzimas utilizadas en trabajos forenses para fines de identificación de líquido seminal (28, 32, 35).

Los resultados que se observaron sobre las muestras secas al aplicarle la electroforesis fueron nulos, esto significa que no hubo separación alguna de las bandas - proteicas del semen, esto principalmente indica que la electroforesis tiene una cantidad límite para su estudio.

Por otro lado sus propiedades como son fisicoquímicas, actividad glicolítica, pueden haberse alterado por el tiempo que duraron guardadas, todo esto coincide con teorías acerca de la pérdida de actividad que dicen que las proteínas pierden o cambian en su conformación en condiciones anormales a su medio para las cuales fueron sintetizadas.

Más sin embargo es importante tomar en cuenta, que la fosfatasa ácida que no es detectada por medios electroforéticos, es identificada por métodos colorimétricos, ya que este color esta en función de la cantidad de fosfatasa ácida en la muestra, métodos que se analizan más adelante.

El estudio electroforético de este tipo de manchas no es recomendado a menos que la cantidad presente sea la adecuada para aplicarle el análisis a las muestras en la búsqueda de la fosfatasa ácida porque es una evidencia - utilizada en los juzgados como una prueba confirmatoria de la presencia de líquido seminal relacionado con la violación.

El estudio de las manchas frescas nos muestra resultados muy claros en relación a las fracciones proteicas presentes en líquido seminal, de acuerdo a la discusión previa. Al analizar los resultados obtenidos de % de fracción proteica contra intervalo de edad (Ver gráficas de 6 a la 11 y la tabla No. 1), en donde se observan las cuatro fracciones antes mencionadas.

En la Gráfica No. 10, se observan las cuatro fracciones antes mencionadas a 5 diferentes intervalos de edad que van de los 20 a los 52 años respectivamente.

Se observa que para la fracción albúmina existe un valor máximo promedio de 26.77% de 26-30 años de edad, pasando a 25.02% a los 31 a 35 años. Lo anterior se explica por que en el rango de los 26 a 35 años de edad existe una mayor transudación de proteínas séricas ya que la albúmina es un marcador seguro de dicha transudación y en este rango se aprecia su más alto % de transudación por lo que se deduce que se da en este rango una etapa de madurez máxima para el sistema de soporte vascular del tracto genital en general (37, 33,34, 35). Por otra parte, del rango comprendido de los 36 años en adelante se observa una caída en el porciento de transudación de albúmina lo que indica el comienzo de algún signo de disfunción en algún sitio del tracto genital masculino (37). Por lo antes mencionado se toma en cuenta el hecho de que una de las distintas proyecciones del semen en la eyaculación seminal, la primera, constituida por secreciones de la próstata y del deferente, especialmente de su porción ampular que arrastran la mayor parte de los espermatozoos que habrán de ser expulsados, pueda afectarse fi-

siológicamente a nivel de su contenido por lo que pudieran afectarse ya sea la concentración de la FAP que se tenga que cuantificar en una muestra como la presencia de algunos millones menos de espermatozoides, de ahí que la literatura reporte sus valores normales tomando como referencia indicativa para edad promedio de 25 años. (37). En el sentido del campo forense, se debe tener en cuenta por ser un dato que si la fracción albúmina se encuentra disminuída es muy posible que el individuo rebasa los 36 años de edad en promedio y que comienza a llevarse a cabo alguna disfunción de vasos deferentes, ampúla prostática así como de una disminución de células espermáticas observables al microscopio, ya que en algunos casos de exudados vaginales sólo se detecta una sola célula espermática en la tinción en fresco.

La electroforesis de zona es un método extraordinariamente valioso para el diagnóstico y evaluación de la función secretora de las glándulas y órganos del aparato genital masculino. Con la obtención de un electroforegrama mostrando la composición de las proteínas seminales presentes en la muestra además de identificar al propio líquido seminal, auxilia en diagnóstico alguna patología existente. (51). Otro parámetro complementario que nos podría auxiliar en cuanto a las muestras azoospermicas sería los valores muy bajos de los niveles de fructuosa y un porcentaje más bajo de la fracción beta, región en donde se encuentra presente la Lactorrerina y la predominancia de componentes prostáticos secretores verificados por una alta concentración de Zinc (mediante absorción atómica se cuantifica el Zn). (37).

Ellison ha demostrado que el contenido de transaminasa, fosfatasa ácida, fructuosa, colesterol y ácido neuroamínico no es constante en muestras de líquido seminal obtenidas durante un período "x" de tiempo, lo cual explica la variabilidad encontrada del α para fracción albúmina y α globulina, en los resultados obtenidos.

Por lo que respecta a la fracción albúmina, que es una proteína "marcada" (utilizada como un marcador natural) se puede observar que su alta concentración en los rangos de 26 a 35 años de edad implica el intervalo de tiempo propio para la reproducción y mejor funcionamiento del tracto genital masculino, por lo que a partir de los 36 años en algunos individuos se inicia una posible disfunción o atrofia de alguno (s) órganos, o el cese de producción de alguna proteína u hormona y que su efecto se ve reflejado más marcadamente, según los resultados obtenidos a partir de los 41 años de edad en adelante en donde incluso proliferan en mayor número los casos de cáncer de próstata u obstrucciones en los conductos seminíferos (51).

A los 52 años se obtuvo un promedio de 16.25 % en promedio para la fracción albúmina lo cual relaciona anomalías de hígado asociadas a riñones, sistema digestivo propios de esta edad. (37, 41, 49, 51).

Para la fracción alfa se observan dos picos o máximos en períodos de 26 a 30 años y 41 a 52 años respectivamente. En esta fracción y colindante a la beta se localizan la fracción proteínica de alfa₁-antitripsina, hemopexina y oromucoide. El primer pico se adjudicaría a la etapa de maduración propia para la reproducción de las glándulas accesorias

y el 20. máximo dado en el último período de edad comprendido entre los 41 a 52 años, involucra posibles procesos inflamatorios o fases en proceso neoplásicos. Además la α_1 -antitripsina es una proteína que presenta la más alta variabilidad de las fracciones principales vistas electroforéticamente (37) en agarosa de líquido seminal y filtración sobre Sephacryl S-300. Según Lizana y Lilja 1987, la albúmina muestra un grado de variación del 17% comparado con el de α_1 -antitripsina que es de aprox. el 120% (Datos obtenidos de un individuo de 38 años durante un período de 12 semanas (37). De ahí se deriva el hecho de que la albúmina - se tome como un marcador de la transudación de las proteínas seminales y séricas para su valoración, identificación y estudio.

Para la fracción beta se observa un elevado % de proteínas en el período de los 26 a 30 años. Es la fracción de mayor % proteico, característica del líquido seminal humano (LSH). Se obtuvo un promedio de 69.53% manteniéndose prácticamente en el siguiente período comprendido entre los 31-35 años siendo de 67.16% promedio. Lo siguiente relaciona tanto la cantidad como la participación de las proteínas que - están involucradas en el mecanismo complejo de la eyaculación, tales como la Fosfatasa ácida prostática, espermina, transferrina, IgA secretora, albúmina, fibronectina, lactoferrina, seminogelina, que participan en los fenómenos de Gelificación y licuefacción seminales. (33,34, 35).

Para la fracción gamma se tiene un promedio de 12.89% para el intervalo de los 26-30 años y de 24.82 para el de 31- a 35 años en promedio de $\%$. Se observa en el 4o. y 5o. intervalo de edad es decir de los 36 años en adelante, la aparición de padecimientos de tipo nefrótico al observarse paulatinamente la baja en esta fracción, representada en los resultados obtenidos de $\%$ de fracción gamma = 5.55 en promedio.

La utilidad de las proteínas del líquido seminal humano como marcadores de la función secretora de las glándulas accesorias genitales se encuentra en constante estudio (33, 34, 35, 41). Algunas razones para este aparente desinterés y constante estudio radica en que no se conoce con detalle la composición de las proteínas del LSH; así como la gran dificultad que existe en su cuantificación y algunos parámetros bioquímicos y fisicoquímicos que varían incluso de muestra a muestra.

No obstante que la población estudiada fue muy heterogénea para la realización del presente trabajo y no fue lo suficientemente grande para obtener valores de referencia, si nos da una aproximación sobre la concentración de las proteínas seminales por lo que se puede decir que en general, de los resultados y gráficos analizadas, resalta un fenómeno interesante que es el referente a que hay una pequeña correlación entre la edad y el $\%$ de cada fracción proteica obtenidas en donde a los 25-30 años de edad se tiene que, de acuerdo a la madurez de los órganos genitales, se obtuvieron porcentajes de proteínas seminales mayores con respecto de los obtenidos con órganos genitales "viejos" (33, 34, 35, 41).

Lo anterior, de ser cierto, vendría a ser una evidencia importantísima en los casos de delitos sexuales, ya que se tendría un parámetro para discernir o diferenciar el origen en relación a la edad, de una muestra de líquido seminal y poder aumentar la probabilidad agravante para el presunto acusado.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFATASA ÁCIDA EN MUESTRAS FRESCAS Y SECAS.

Colorimetría: p-nitrofenilfosfato (sustrato).

La gráfica No. 13 nos muestra la actividad enzimática de la fosfatasa ácida medida espectrofotométricamente en actividad expresada en promedio en UI/L. En ella se observa que la actividad de la PAP es estable a temperatura ambiente (siendo de 2 horas la toma de muestra hasta su estudio). Por otra parte se observa que el rango congelado fue por 6 meses a -4°C y refrigerado que fue de 2 a 8°C , no nos mantiene estable la actividad de la PAP donde se observa que la muestra refrigerada pierde 6 veces la actividad con respecto a la del medio ambiente. La estabilidad de la enzima se estima según Davies (2,7,51) a temperatura ambiente y dentro del intervalo de tiempo arriba indicado, lo que indica que si no se pueden trabajar las muestras dentro de las 2 horas siguientes a la obtención de la muestra se indica ya sea una congelación a -20°C (51) o en refrigeración con un ajuste en el pH alrededor del pH óptimo para la enzima (pH=6.5) o con el uso de un conservador que inhiba la acción de las proteosas presentes en la muestra de líquido seminal fresco, (ácido acético diluido (51).

En esta gráfica se trató de ilustrar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PAP.

Por consiguiente la gráfica No. 14 muestra la actividad enzimática en función de los 5 intervalos de edad que presentaron los donadores y se encontró que en el primer intervalo la actividad se ve incrementada. Las muestras frescas fueron refrigeradas de 4 a 96 horas a $2-8^{\circ}\text{C}$ y se congelaron por 6 meses a -10°C antes de iniciar el estudio. (35).

En el segundo el cuarto intervalos, los rangos de actividad promedio se mantienen casi constantes y en el quinto intervalo hay un decremento de PAP, indicando el inicio de un proceso de estrofia o disfunción prostática ya característico en individuos de esta edad y agudizándose de los 50 años en adelante; de ahí que la secreción prostática modifique su composición química y sus propiedades fisicoquímicas (35) reflejándose en una menor concentración de PAP, de acuerdo a Allard (1979), Lizana (1987) (2,35).

En la gráfica No. 15 se observan un incremento en la actividad enzimática de PAP. Las muestras se encuentran en soportes de tela y gasa guardados, de los años 1988 y son en soportes de portaobjetos, las muestras de 1989.

Si se plantea que los resultados están en función del tiempo y aunado a esto la cantidad presente, a mayor tiempo transcurrido de almacenaje, menor es la actividad enzimática.

Se observa una actividad enzimática 4 veces más para las muestras de 1988, comparadas con las de 1989 y de dos y medio veces para las de 1990.

Por lo que si las muestras de 1988 presentan mayor actividad enzimática, esto se debe a que en el soporte de tela y gasa, contenían una concentración mayor de líquido seminal que el de los portaobjetos.

La cantidad de líquido seminal que traen los exudados que se les toma a las 'víctimas' es relativo; las víctimas no acuden inmediatamente a poner la demanda correspondiente, por lo que existe un intervalo de tiempo entre los hechos y la toma de la muestra, lo que afecta la concentración de PAP y ésta se afecta también al encontrarse en condiciones adversas como sucede

en la vagina con su pH y flora bacteriana, principalmente.

Por otro lado, el semen, cuando es eyaculado, dura gelificado de 15 a 30 minutos en el interior de la vagina y posteriormente presenta el fenómeno de licuefacción, por lo que si la víctima deambula y realiza actividades normales y al llegar a la Agencia para quejarse, puede haber escurrimiento de la mayor parte del eyaculado.

Es necesario tener un límite bien delimitado de donde poder obtener un criterio que ubique el rango negativo y el positivo en la determinación de la PAP en función de la actividad enzimática presente en cada muestra, sobre todo en los casos arriba mencionados, en donde se tengan cuantificaciones bajas que aparecen en un resultado negativo. En la gráfica No. 16 se observa que el promedio de 1.39 UI/L., se dió para el rango=negativo y no es sino exudados vaginales que se utilizaron como control negativo (muestras para estudio de Papanicolao)., de ahí que de 1.39 UI/L en adelante es positivo para la prueba con p-nitrofenilfosfato y por debajo de este promedio es negativo, lo que indica que la técnica registró la PA propia de la cavidad vaginal o que en algunos casos esta ligeramente incrementada (pero no por encima de 1.39 UI/L), debido a la presencia de microorganismos patógenos como bacterias, parásitos, hongos, etc. (detectados en el estudio).

La gráfica 16 arroja resultados de actividad enzimática relacionada con el tipo de muestra, éstas sufrieron una forma diversa de almacenaje, hasta su estudio.

Se observará que la actividad en las muestras secas, es mayor comparada con las frescas, esto se debe a que se con-

serva mejor en las secas; las frescas se guardaron a temperatura de refrigeración que no son las adecuadas, siendo de 2 a 8 C y la congelación fué a -4 C, por lo que la enzima - sufre cambios en su actividad, lo que se manifiesta en un descenso de la misma.

Las muestras frescas fueron refrigeradas en un principio, después fueron congeladas a -4 C durante 6 meses, lo que -repercutió en la baja de actividad.

Otro análisis que se desglosa de la misma gráfica (G-16) es que la actividad de las muestras en seco es mayor que la que se detectó para las muestras en fresco.

Lo anterior derivó de que las muestras en seco se extrajeron de diversos soportes sólidos entre los que se encuentran diferentes y variadas texturas de tejidos de prendas íntimas y externas como es el caso de los forros de los sacos y vestidos. Nos enfocamos más específicamente a los colorantes que tifican las ropas íntimas de las víctimas y observamos que pudieron interferir con la absorbancia de los valores de la FAP por lo que se cree que la interferencia y el incremento en la actividad enzimática se debió a los colorantes presentes en las prendas, probablemente del tipo del índigo y azoicos, ya que era muy rara la prenda de constitución textil de lana o seda, en general eran de poliéster o nylon (según Fúroz M., 1970).

ENZIMÁTICA: Timolftaleína sódica (sustrato).

En la gráfica No. 17 aparecen los resultados para TSM, como sustrato de diferentes intervalos de edad y se aprecia un aumento en la actividad en el intervalo de los 36-40 años de edad. Lo anterior concuerda con lo reportado por (2,3,35)

Lizana, Allard y Davies, que efectuaron un estudio en un individuo de 38 años de edad y donde aparece una concentración de FAP que se ve incrementada en esta edad, paralelamente a la transudación de la Lactoferrina usada también como marcaje de la transudación proteínica del semen.

No se observa una relación directa con la edad, pero sí se puede relacionar las actividades con la edad. Debido a que hay actividad que se marca con la edad.

Las muestras se refrigeraron entre 2 y 24 horas a 8 C antes de iniciar su estudio, lo que afectó de una forma poco marcada en la actividad enzimática.

La gráfica 18, da una relación de la actividad enzimática de la FAP con la edad de las muestras que fueron guardadas desde 1988, 1989 hasta 1991, fecha de su estudio con el sustrato de Timolftaleína sódica monofosfatada.

Existe una mayor actividad enzimática en las muestras secas que provienen de 1988, hay un descenso en la actividad en las muestras que son de 1989, éstas provienen de exudados que les fueron tomados a mujeres violadas ; éstas se presentan varias horas o días incluso, después de la violación, a la Agencia a levantar la demanda correspondiente, restando así las posibilidades de detectar la adecuada actividad de la FAP.

La actividad de la FAP, decrece con respecto del tiempo a una temperatura ambiente, así cuando no se adiciona ningún conservador a la muestra o no se le dan las condiciones de estabilidad a la enzima, desapareciendo toda actividad a los dos meses (Davies).

Se ha visto que, enzimas más sensibles que la FAP, han mostrado actividad en muestras secas con una antigüedad de 5, 10 y 23 años siendo conservadas a temperatura ambiente tal como es la Colina (4).

Las muestras se guardaron en refrigeración a un tiempo máximo de 48 horas hasta su estudio, la gráfica marca el patrón correcto acerca de que las muestras frescas deben presentar mayor actividad enzimática con respecto de las secas comparándolas a su vez con los testigos negativos.

Se ha de insistir en que la implementación de una técnica que evalúe la actividad enzimática de FAP, requiere siempre de un control de calidad extremo por tratarse de una proteína termolábil que varía de acuerdo al tipo de individuo, al analista, a la técnica utilizada, etc.

Ambas técnicas, p-NPP y TSM, son de estudio reciente en lo concerniente al tipo de muestra analizada. Existen técnicas con estos sustratos, validadas y estandarizadas y sus actividades reportadas en el Sistema Internacional de Unidades (S.I.U.= UI/L) usando muestras biológicas como el suero sanguíneo o la orina, sin embargo no se ha trabajado con líquido seminal, lo cual es de reciente utilidad y su aplicación es ampliamente diseminada en los laboratorios de química forense y criminalística.

VI.1

C O N C L U S I O N E S.

- 1.- La separación de las proteínas seminales: albúmina, α, β y γ -globulinas por electroforesis en acetato de celulosa mediante la técnica estandarizada en este trabajo es confiable para identificación confirmativa para el líquido seminal.
- 2.- En los métodos colorimétricos utilizados en el presente trabajo se identifica actividad de la fosfatasa ácida - hasta un límite de dilución de 1 a 100, en cantidades no identificables en electroforesis por acetato de celulosa.
- 3.- Las muestras secas almacenadas por más de 1 mes ya no se detecta la presencia de proteínas seminales por electroforesis en acetato de celulosa.
En muestras secas almacenadas en condiciones de medio ambiente hasta por 2 años, se detectó actividad enzimática de la fosfatasa ácida por los métodos colorimétricos usando como sustrato la timolftaleína y p-nitrofenilfosfato.
- 4.- Las muestras frescas almacenadas en refrigeración y congelación por más de 24 horas disminuye la actividad enzimática de la fosfatasa ácida.
- 5.- El estudio obtenido del porcentaje de proteínas seminales y actividad enzimática de PAP, sugieren que existe una posible correlación con la edad de los donadoras involucrados en este proyecto.

VI. 2. R E C O M E N D A C I O N E S .

- 1).- Se recomienda tener un estricto control de Calidad en lo que se refiere al lavado del material que va a destinarse para realizar las determinaciones enzimáticas de PAP.

La más mínima traza de detergente puede restar una cantidad considerable del nivel real de la PAP en la muestra problema, resultando en una errónea - cuantificación de la enzima y en ocasiones, en su pérdida total, dando un falso negativo.

- 2).- Para el presente estudio se tuvo que $n=65$ muestras en promedio para cada variante, fresca, seca y negativo.

Se cree de utilidad convertir a $n= 200$ a 300 muestras para cada variante con el fin de aumentar el grado de confiabilidad y analizar la presencia de correlaciones entre el % de Proteínas seminales y el origen de nacimiento de los individuos que participan en el estudio, tanto del D. F. como de las - diferentes entidades de la República M. (Provincia).

- 3).- Toda técnica enzimática requiere de un estudio concienzudo y dedicado que llevé como producto final a cubrir las necesidades, en el caso particular presente, del Laboratorio de Química forense.

Por ello, para el caso de las 2 técnicas incluidas en este estudio, se sugiere ampliar las investigaciones en los parámetros de Control de Calidad, - Pruebas de estabilidad, así como de ampliar el tamaño de $n=$ a muestras de Papanicolaou, para amplia

el límite de cuantificación de la enzima PAP, dato preciso que auxilia en la discriminación adecuada de las muestras problema.

Los estudios deben ser repetidos y variados, ya que se tiene en cuenta que no existen las suficientes investigaciones de técnicas de cuantificación de actividad enzimática en líquido seminal, por lo que en México y en la actualidad, es un campo aún en vías de obtener más información.

VI.3. B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Alexander, J. W., "Inmunología Clínica ", Ed., Salvat., 1a. ed., España, 1972., pp., 36.
- 2.- Allard, J., Davies, A., Further information on the use of p-nitrophenyl phosphate to quantitative acid phosphatase on vaginal swabs examined in cases of sexual assault., Med.Scie. Law., 19; 3; 170, (1979).
- 3.- Anuario Estadístico de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal (1991).
- 4.- Benítez Huerta., A., "Investigación Bibliográfica de algunas técnicas utilizadas en Química Legal para identificación de semen"., Tesis. U.N.A.M., México., 1986.
- 5.- Barret, S.T., "Inmunología"., Ed. Interamericana., 1a., ed., México, 1972., 109-110, 234.
- 6.- Bonnie, S.D., "Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques"., Ed. Plenum Press., 2a., ed., New York and London, 1987., pp., 1-10.
- 7.- Davies, A., A preliminary investigation using p-nitrophenyl-phosphate to quantitative acid phosphatase on swabs examined in cases of sexual assault; Med. Scie. Law; 18;3; 174-178; (1978).
- 8.- Davies, A., Wilson, E., The persitence of seminal constituents in the human vagina., Forensic Scie... 3;pp., 45-55 (1974).
- 9.- Davies, B. D., "Tratado de Microbiología"., Ed., Salvat., 2a. ed., España, 1983., pp., 664-666.

- 10.- Davidsohn, I., "Diagnóstico clínico por el Laboratorio"., Ed. Salvat., 6a., ed., España, 1979., pp., 1347-1354.
- 11.- Divall, G.B., The application of electrophoretic techniques in the field of criminology., Electrophoresis., 6; 249-258, (1985).
- 12.- Fudenberg, H.H., "Inmunología Clínica"., Ed., El Manual Moderno., 1a., ed., México, 1982., pp., 357-362.
- 13.- Franco, M., "Hematología Forense"., Ed. Porrúa., 1a., ed., 1984.
- 14.- Gelman Instrument Company "Hemoglobin Electrophoresis System".
- 15.- Gerarld, S., Adams, and Creig, V.T., Acid phosphatase characterization., Journal of Chem. Education., 54., 12; Dic., (1977), pp., 780-782.
- 16.- Goldblatt, M.W., Constituents of Human seminal plasma., J. Physiol., 84; 208, pp. 1346-1357..
- 17.- Gordon, R.L., "Lo esencial de la Inmunología"., Ed., Manual Moderno., 2a., ed., México, 1982, pp. 57-61.
- 18.- Gray, G.W., Electroforesis., Scie. Amr., 3-11 (1951).
- 19.- Gray,S., Huggins Ch., Electrophoretic analysis of human semen., Am. J. Physiol., 4; 351 (1942).
- 20.- Grunba m, B.H., Electrophoresis in forensic applications., Industrial research., 15 ; 13-20 (1977).
- 21.- Gurria rafols, M., Control de calidad en el Laboratorio Clínica., Bioquímica., 1 ; 6 (1977) pp. 125-130.
- 22.- Ham, A.W., "Tratado de Histología", Ed. Interamericana., 6a. ed., México, 1969, pp. 869-956.

- 23.- Hamilton, H.K. and Rose, M.B., "Diagnóstico Clínico"., Ed. Interamericana., 11., ed., México, 1985., pp. 764-768.
- 24.- Harper, H.A., Rodwell, V.W., "Manual de Química Fisiológica"., Ed. Manual Moderno., 17 a., ed., México, 1980, pp. 216.
- 25.- Hooft, P.J., and Van de Voorde, P., The Zinc test as an alternative for acid phosphatase spot tests in the primary identification of seminal traces., Forensis Sciences International, 47 (1990) pp. 269-275.
- 26.- Huggins, Ch., Scott, W.W., and Heinen J.H., Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles., Chemistry of Secretions of Male reproductive glands., 19 (1942) pp. 467-473.
- 27.- Houssay., B.A., "Fisiología Humana"., Ed. Ateneo., 2a., ed., Argentina, 1978, pp. 422-431.
- 28.- Hueske, E.E., Techniques for extraction of spermatozoa from stained clothing: a critical review., J. of. Forensis Scie., 22; 3; 596 (1977).
- 29.- Jürgen Thorwald., "El Siglo de la investigación criminal".
- 30.- Kantola, M., Saaranen, M., Pertula, V.T., Selenium and glutathione peroxidasa in seminal plasma of men and bulls., J. Reprod. Fertil ., 83 ; 785-794 (1988).
- 31.- Kelsey, R.L., Clinical electrophoresis., Illinois Masonic Medical Center., 5 ; 34 (1966).
- 32.- Kloosterman, A.D., Pow- Arnov, M., Comparison of enzyme assay and

- radioimmunoassay dir the measurement of human acid phosphatase in cases of sexual assault., Forensic Sciec. International., 25,45-55 (1984).
- 33.- Lilja, H., Olbring, J., Rannevik, G., Bertil, L. C., Seminal Vesicle-Secreted Protein and their Reactions during Gelation and liquefaction of Human semen., J. Clin. Invest.; 80; 281-285 (1987).
- 34.- Lilja, H., Structure and function of prostatic and seminal vesicle-secreted proteins involved in the gelation and liquefaction of human semen; Scand. J., Clin. Lab. Invest.; 48; suppl. 191; 13-20 (1988).
- 35.- Lizana, J., Eneroth P., Byström, S., Bygderman, M., Studies on the constancy on trasudated and locally produced proteins in human seminal plasma., Int. Fertil., 32 ; 71-76 (1987).
- 36.- Longworth, L. G., Shedlovsky, Th., and Macinnes, D., Electrophoretic patterns of normal and pathological human blood serum and plasma., Electrophoretic patterns of blood serum and plasma., 17 (1939) pp. 399-412.
- 37.- Lynch, M., "Métodos de Laboratorio"., Ed., Interamericana., 2a., ed., México, 1972., pp. 329-348, 353.
- 38.- Quinlivan, W.L.G., Analysis of the proteins in human seminal plasma., Archives of biochemistry and biophysies., 127; 680-687 (1968).
- 39.- Ramchandra, R., Ayyagary, M. D., Asgeraly, T., Seminal plasma proteins of fertil and infertil men analysed by two-dimensional-electrophoresis., Am. J. Obstet. Gynecol., 157; 1528; (1987).

- radioimmunoassay for the measurement of human acid phosphatase in cases of sexual assault., Forensic Scienc. International., 25,45-55 (1984).
- 33.- Lilja, H., Olbring, J., Rannevik, G., Bertil, L. C., Seminal Vesicle-Secreted Protein and their Reactions during Gelation and liquefaction of Human semen., J. Clin. Invest.; 80; 281-285 (1987).
- 34.- Lilja, H., Structure and function of prostatic and seminal vesicle-secreted proteins involved in the gelation and liquefaction of human semen; Scand. J., Clin. Lab. Invest.; 48 ; suppl. 191; 13-20 (1988).
- 35.- Lizana, J., Eneroth P., Byström, S., Bygdeman, M., Studies on the constancy on trasudated and locally produced proteins in human seminal plasma., Int. Fertil., 32 ; 71-76 (1987).
- 36.- Longsworth, L. G., Shedlovsky, Th., and Macinnes, D., Electrophoretic patterns of normal and pathological human blood serum and plasma., Electrophoretic patterns of blood serum and plasma., 17 (1939) pp. 399-412.
- 37.- Lynch, M., "Métodos de Laboratorio"., Ed., Interamericana., 2a., ed., México, 1972., pp. 329-348, 353.
- 38.- Quinlivan, W.L.G., Analysis of the proteins in human seminal plasma., Archives of biochemistry and biophysies., 127; 680-687 (1968).
- 39.- Ramchandra, R., Ayyagary, M. D., Asgeraly, T., Seminal plasma proteins of fertil and infertil men analysed by two-dimensional-electrophoresis., Am. J. Obstet. Gynecol., 157; 1528; (1987).

- 40.- Randal A., Skidgel., Deddish, A., Davies, M.R., Isolation and characterization of a Basic Carboxypeptidase from Human Seminal Plasma., Archives of biochemistry and biophysics., 267; 2; 660-667 (1988).
- 41.- Rodríguez Villa, L., Estudio del Líquido Seminal., Bioquímica, IV., 26; (1982), 941-945.
- 42.- Ross, V., Moore, D.H., and Miller, E.G., Proteins of Human seminal plasma., J. Biol. Chem., 144 ; 667-77 (1942).
- 43.- Roy, A.V., Brower, M.E., and Hayden, J.E., Clin., Chem., 17; 1093 (1971)., pp., 667-677.
- 44.- Sensabaugh, G.F., Blake, E.T., & Northet, D.H., Genetic Markers in semen, III: Alteration of phosphoglucosmutase ospzyme patterns in semen contaminated with saliva., Journal of forensic Scie., 25; 3; 470-478 (1980).
- 45.- Sensabaugh, G.F., Isolation and characterization of a semen specific protein from human seminal plasma: A potencial new marker for semen identification., Journal Scie., 18,106-115 (1977).
- 46.- Sttand,F.L.,"Fisiología humana"., Ed. Interamericana, 1a. ed., México, 1982, pp. 36-43.
- 47.- Takahashi, Yuko., Manabe,T., Higuchi, N., Okuyama, T., Identificación map of human plasma proteins: Micro two-dimensional electrophoresis followed by multiple insunoreplica technique., 6; 462-467, (1985).
- 48.- Tietz, N.W., "Química Clínica Mcderna"., Ed. Interamericana., 1a., Ed., México, 1970, pp., 224-226, 946-950.

- 49.- The American College of Obstetricians and Gynecologists., "Gineco-Obstetricia actual", Ed., Manual Moderno., 1a. ed., México,- 1983, pp., 413-416.
- 50.- The Manual Merck de Diagnóstico Y Terapéutica., Ed., Interamericana., 7a., ed., México, 1986, pp., 1435, 1507-1510.
- 51.- Tood-Sandford, "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio"., Ed., Salvat., 6a. ed., México, 1979, pp. 566-567.
- 52.- Vander., A.J., et. all., "Fisiología Humana"., Ed. Mac. Graw Hill., 1a., ed., México, 1978, pp., 12-14.
- 53.- Weber, K., Osborn, M., The reability of molecular weight determination by dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis., J. of Biological Chem., 244; 16; 4406-4412., (1969).
- 54.- Werner, P.F., Wedge-shaped ult thin polyacrylamide and agarosa gels for isoelectric focusing: A new method fortotyping phosphoglucomutase (PGM) in semen stains and vaginal swabs., Electrophoresis., 6; 19-22 (1965).