



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

FACTORES DE INTERFERENCIA EN LA DETERMINACIÓN DE LA
ENZIMA FOSFATASA ÁCIDA EN CASO DE DELITOS SEXUALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N :

ALATRISTE SOLANO EDGAR

BUENDÍA RODRÍGUEZ LESLIE VIRIDIANA

JUNIO, MÉXICO D.F.

DIRECTOR: Q.F.B. MIGUEL ANTONIO PÉREZ VELÁZQUEZ

ASESOR: Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO



AGRADECIMIENTOS

A mis Padres Rolando Uribe y María Leonor, mis Hermanos Faustina y Hugo Rolando, y a toda mi familia por darme la oportunidad de estar realizando este proyecto y ayudarme a alcanzar mis metas y objetivos, por que se que también son los suyos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme el conocimiento para ejercer mi profesión con honradez y ética.

A mi novia Karina, sabes que te adoro con todo mi corazón; y a su familia por apoyarme de todas las formas posibles.

A todas mis amigas y amigos de la carrera, que me han acompañado en todo este trayecto, brindándome su apoyo y confianza, me quedaría corto si no nombrara a cada uno de ustedes, solo ustedes saben que cuentan conmigo.

A mi Director Q.F.B. Miguel Antonio Pérez Velázquez y Asesor Q.F.B. José Oscar González Moreno por apoyarme en la realización de este proyecto, ante todo saben que les tengo un gran respeto y confianza.

A la Procuraduría General de Justicia del Estado de México, Lic. Luis Ángel Ceja Subdirector del Instituto de Servicios Periciales de la Delegación Regional de Netzahualcóyotl. al Perito Químico Q.F.B. Juan Carlos Herrera Álvarez del Área de Química Forense de la misma subdirección por todo su apoyo brindado.

A la Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez por el apoyo brindado, en las instalaciones y equipo del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Multidisciplinaria Zaragoza, así como a los profesores del laboratorio de la clínica que me apoyaron e incentivaron a seguir con este proyecto.

A los profesores que de cualquier forma, aportaron su granito de arena a este proyecto para su realización

Y en especial en mi persona, por que se dedico por completo a la realización de este trabajo y que enfrente las dificultades que se presentaron.

Edgar Alatraste Solano

DEDICADO:

Con mucho amor y cariño para los dos maravillosos seres que me invitaron a esta vida:

Mi padre, Mario Buendía, por enseñarme a hacer las cosas bien desde la primera vez y siempre, a tener el coraje, la dedicación y la fortaleza para alcanzar mis metas, así como para aprovechar al máximo las oportunidades que se me presentan.

Mi madre, Patricia Rodríguez, porque con sus consejos me enseñó a no darme por vencida, a ser una mujer fuerte, íntegra e independiente, por ser la mejor de mis profesoras en la universidad de la vida y por estar siempre a mi lado apoyándome cada vez que lo necesito.

También, con especial cariño para mis compañeros de vida:

Mi hermano mayor, Julio César, por compartir todos esos juegos y travesuras de infancia, por ser mi cómplice, mi amigo y un excelente consejero.

Mi hermana, Stephanie Michelle, porque a pesar de ser la más pequeña, ha sido lo suficientemente madura para ser la mejor de mis amigas, mi confidente, mi motivo a ser cada día mejor y así darle el mejor de los ejemplos.

A ustedes cinco GRACIAS, por formar junto conmigo el mejor de los equipos, por ayudarme a llegar y acompañarme en este importante momento de mi vida, los amo.

En memoria de mis abuelos, Esperanza, Antonio y Gregorio, a este último, porque sé que a pesar de todo siempre tuvo fe en que llegaría a este momento, en el que sé está conmigo.

AGRADECIMIENTOS:

Muy especialmente a mis tíos, Raúl y José Antonio, por apoyarme en todo momento, por ser como mis hermanos mayores, mis cómplices, por todos los momentos divertidos que me han dado desde mi infancia.

Al Perito Miguel por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por su tiempo, paciencia, y por todas esas explicaciones largas pero enriquecedoras.

Al profesor Oscar, por su ayuda, paciencia, explicaciones, tiempo, e interés para la realización de este trabajo.

A mi compañero de Tesis, Edgar Alatríste, por aventurarse junto conmigo en este trabajo.

Al perito Armando Méndez, por su apoyo y sobre todo su amistad durante mi servicio social, así como a mis compañeros, Carolina, Yuziky, Dalia, Lalo, Mariela, Alan, Emmanuel, Iris, Irving, Luis y Eliza con los que compartí casi un año lleno de experiencias y por que juntos descubrimos el maravilloso mundo de la Química Forense.

A mis amigos de la carrera, a todos y cada uno de los que compartieron algún momento conmigo, especialmente a Carlos Barona y Alida Romero, mis amies, mis incondicionales, con los que he compartido momentos de alegría tristeza, distancia... pero en los que sé, siempre podré confiar.

A mi primera jefa, Irene, por darme la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo, por su apoyo incondicional y por la confianza que me ha brindado, con la cual también me ha enseñado a confiar en mí a nivel profesional.

A Toño Su, Fer Flores, Yadira, e Isha, por hacer mi ambiente laboral más agradable, divertido y lleno de música, pero sobre todo, porque juntos hemos aprendido a crecer profesionalmente apoyándonos y capacitándonos unos a otros con la finalidad de ser cada día mejores en nuestro trabajo.

Leslie Viridiana Buendía Rodríguez

CONTENIDO GENERAL:

CONTENIDO DE IMÁGENES:	3
CONTENIDO DE TABLAS	4
CONTENIDO DE GRÁFICAS:	6
INTRODUCCIÓN:	7
Marco teórico:	9
LÍQUIDO SEMINAL	9
1. Concepto	9
2. Órganos que participan en la elaboración del semen	9
3. Biota microbiológica del tracto genital masculino	10
4. Propiedades Físicoquímicas del Esperma	11
4.1 Propiedades físicas	11
4.2 Composición Química	11
5. Fracciones del volumen total del semen	13
6. Anatomía y fisiología del espermatozoide	13
7. Mecanismo de la eyaculación	14
SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO	16
1. Generalidades	16
2. Biota microbiológica del tracto genital femenino	17
MARCO JURIDICO	19
1. Código Penal Federal	19
2. Código Penal del Estado de México	22
3. Código Procedimientos Penales del Estado de México	22
MANCHAS DE SEMEN	23
1. Búsqueda de indicios	23
1.1 Investigación sobre la víctima de agresión sexual	23
1.2 Búsqueda y recolección de indicios en la escena de un hecho criminal	24
2. Levantamiento de muestras.	24
2.1 Semen líquido:	24
2.2 Exudado anal:	24
2.3 Exudado vaginal:	25
3. Composición química de la fibra de algodón de los hisopos	25
4. Embalaje:	26
5. Tensoactivos y sistemas detergentes	27
6. La problemática en muestras de delitos contra la libertad sexual	28
IDENTIFICACIÓN DE SEMEN	29
1. Pruebas de orientación	29
1.1 Examen con luz ultravioleta	29

1.2 Examen cristalográfico	30
1.2.1 Prueba de Florence.	30
1.2.2 Prueba de Barberio.	30
1.3 Concentración de zinc en contenido vaginal	31
1.4 Prueba para la determinación enzimática de la fosfatasa ácida	31
1.4.1 Antecedentes	31
1.4.2 Fundamento de la prueba	32
2. Bioquímica de la Enzima Fosfatasa Acida (ACP) Y Fracción Prostática (PAP)	37
3. Pruebas de confirmación	38
3.1 Examen Directo	38
3.2 Tinción.	39
3.3 Antígeno Prostático Específico (p30)	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	41
OBJETIVOS:	42
HIPOTESIS:	42
DISEÑO EXPERIMENTAL:	43
METODOLOGÍAS:	44
RESULTADOS.	52
ANÁLISIS DE RESULTADOS	78
CONCLUSIONES	85
PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	86
REFERENCIAS:	88

CONTENIDO DE IMÁGENES:

Figura No.1 Anatomía del aparato reproductor masculino.	10
Figura No.2 Anatomía del aparato reproductor femenino.	17
Figura No.3 Estructura Química del Algodón	26
Figura No.4 Ésteres de fosfato	27
Figura No.5 Secuencia de formación del colorante azoico	35
Figura No.6 Mecanismo de reacción de la formación del colorante azoico.	36
Figura No.7 Reacción general de la fosfatasa ácida.	37

CONTENIDO DE TABLAS

MARCO TEORICO

Tabla No.1 Estadístico de pruebas solicitadas correspondientes a delitos sexuales, registrados en 2010.	8
Tabla No.2 Biota microbiana del tracto genital masculino	11
Tabla No.3 Resumen de la composición del líquido seminal humano.	15
Tabla No.4 Biota microbiana del tracto genital femenino	18
Tabla No.5 Procedimiento típico para la realización de una prueba cualitativa de la presencia de FA.	34
Tabla No.6 Formato de tabla para el reporte de resultados de la evaluación del embalaje	48
Tabla No 7 Formato para el registro prueba cualitativa relación de m.o. con el tiempo reacción del reactivo	51

RESULTADOS

Tabla No.8 Evaluación de hisopos estériles	52
Tabla No.9 Evaluación de cotonetes.	53
Tabla No.10 Resultado de sobres de papel	54
Tabla No.11 Estadístico de resultados de sobres de papel	55
Tabla No.12 Resultado de bolsas de plástico	57
Tabla No.13 Estadístico de resultados de bolsas de plástico	58
Tabla No.14 Resultados de tubos de vidrio	60
Tabla No.15 Estadístico de resultados de tubos de vidrio	61
Tabla No.16 Evaluación de detergentes	63
Tabla No.17 Resultados de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida	64
Tabla No.18 Frecuencia del material usado para la toma de muestra de la prueba de fosfatasa ácida	65
Tabla No.19 Material de embalaje de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida.	66

Tabla No.20 Aislamiento de Bacterias a partir de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida _____	67
Tabla No.21 Datos de las muestras con resultado Fosfatasa Positivas sin crecimiento bacteriano _____	68
Tabla No.22 Relación de poblaciones aisladas por cada muestra analizada para la prueba de fosfatasa ácida _____	68
Tabla No.23 Clasificación tintorial de Gram de bacterias a partir de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida _____	69
Tabla No.24 Géneros identificados a partir de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida _____	71
Tabla No.25 Prueba cualitativa del reto directo de las bacterias vs tiempo de reacción del reactivo de la fosfatasa _____	72
Tabla No.26 Datos de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas ____	73
Tabla No.27 Material de recolección de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas _____	75
Tabla No. 28 Tipo de embalaje de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas _____	76
Tabla No.29 Datos de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas ____	77

CONTENIDO DE GRÁFICAS:

RESULTADOS

Gráfica No.1 Determinación de la enzima fosfatasa ácida vs tiempo de almacenamiento en sobres de papel. _____	55
Grafica No.2 Total de células espermáticas visualizadas vs tiempo de almacenamiento en sobres de papel. _____	56
Gráfica No.3 Porcentaje de células espermáticas completas vs cabezas de espermias almacenadas en sobres de papel. _____	56
Gráfica No.4 Actividad de la enzima fosfatasa ácida vs tiempo de almacenamiento en bolsas de plástico. _____	58
Grafica No.5 Total de células espermáticas visualizadas vs tiempo de almacenamiento en bolsas de plástico. _____	59
Gráfica No.6 Porcentaje de células espermáticas completas vs cabezas de espermias observadas almacenadas en bolsas de plástico. _____	59
Gráfica No.7 Actividad de la enzima fosfatasa ácida vs tiempo de almacenamiento en tubos de vidrio. _____	61
Grafica No.8 Total de células espermáticas visualizadas vs tiempo de almacenamiento en tubos de vidrio. _____	62
Gráfica No.9 Porcentaje de células espermáticas completas vs cabezas de espermias almacenados en tubos de vidrio. _____	62
Grafica No.10 Resultados de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida _____	64
Gráfica No.11 Frecuencia del material para toma de muestra _____	65
Gráfica No.12 Estadístico del tipo de material de las muestras analizadas _____	66
Gráfica No.13 Aislamiento de bacterias a partir de las muestras analizadas. _____	67
Gráfica No.14 Poblaciones aisladas por muestra analizada. _____	69
Gráfica No.15 Estadístico de clasificación de Gram de bacterias obtenidas. _____	69
Gráfica No.16 Estadístico de Géneros identificados a partir de muestras analizadas _____	71
Gráfica No.17 Frecuencia del material de muestreo de pruebas fosfatasa falso positivas _____	75
Gráfica No.18 Frecuencia del embalaje de pruebas fosfatasa falso positivas _____	76
Gráfica No.19 Aislamiento de bacterias de pruebas fosfatasa falso positivas _____	77

Presentan:

Alatraste Solano Edgar, Buendía Rodríguez Leslie Viridiana.

INTRODUCCIÓN:

La química forense es un área de gran importancia dentro de la procuración de justicia, ya que dentro de esta se realizan diversos estudios que son de gran interés para resolver el cuestionamiento realizado por parte del ministerio público acerca de algún hecho delictivo.

Entre las peticiones realizadas con mayor frecuencia por parte del ministerio público, encontramos aquellas que se refieren a los delitos cometidos en contra de la libertad sexual, por lo que para esta área resulta de gran importancia el conocimiento de técnicas que orienten al investigador acerca de la presencia, en este caso, de líquido seminal.

En los casos de delitos sexuales, lo que se busca es precisamente la presencia de semen en el cuerpo o prendas de la víctima, esto se realiza mediante la observación de manchas en el caso de prendas, las cuales pueden ser observadas mediante una lámpara de luz UV, o bien mediante la búsqueda de constituyentes seminales, en exudados vaginales, rectales u orales recabados de la víctima.

Para el análisis de prendas o exudados, el analista se auxilia de técnicas orientativas como el caso de la prueba de la fosfatasa ácida, así como de técnicas confirmatorias como la visualización de células espermáticas y la detección del antígeno prostático específico (PSA) mediante inmunocromatoplaqa.

En el caso de la mencionada prueba de la fosfatasa ácida, se ha notado que durante el análisis se pueden obtener resultados falsos positivos debido a que esta enzima no es específica del semen, sino que se encuentra presente en diferentes fluidos biológicos, así como en algunos microorganismos y vegetales, sin embargo también se sabe que la fosfatasa se encuentra en mucho mayor concentración en líquido seminal que en los antes mencionados.

Derivado de lo anterior surgió la necesidad de evaluar los posibles factores, que inciden en un resultado del tipo falso-positivo, y así comprender, como afectan estos factores en el resultado final de la prueba, sugiriendo y/o deduciendo, las condiciones y características que deben tener las al recolectar muestras que serán analizadas, con la finalidad de disminuir resultados falso-positivo.

Los análisis solicitados de forma rutinaria son las pruebas para determinar la presencia de la enzima fosfatasa ácida, búsqueda de espermatozoides y

antígeno prostático específico, en el Área de Química Forense de la Subdirección del Instituto de Servicios Periciales de la Delegación Regional de Ecatepec con sede en Texcoco, en casos de presuntos delitos sexuales en muestras remitidas al laboratorio para su intervención en el hecho.

Durante el año 2010, el laboratorio de química forense con sede en Texcoco, se atendieron 1108 intervenciones relacionadas con delitos sexuales, los cuáles se detallan en la siguiente tabla.

Tabla No.1 Estadístico de pruebas solicitadas correspondientes a delitos sexuales, registrados en 2010.

Delegación Ecatepec		Delegación Nezahualcoyotl	
Subprocuraduría Ecatepec		Subprocuraduría Nezahualcoyotl	
	No. de pruebas solicitadas		No. de pruebas solicitadas
Ecatepec	294	Neza. Perla	52
San Agustín	13	Neza. Palacio	113
Tecamac	49	Chimalhuacán	110
Otumba	38	La Paz	59
Coacalco	44	Ixtapaluca	50
Cd. Cuauhtémoc	02	Campestre	16
Xalostoc	17	Chicoloapan	10
Teotihuacán	16	R. Costitlán	14
Acolman	04	Subprocuraduría Amecameca	
Subprocuraduría Texcoco		Amecameca	37
Texcoco	62	Chalco	52
Subtotal	539	Valle de Chalco	56
		Subtotal	569

Datos obtenidos de los libros de gobierno empleados durante el periodo comprendido del 01 de enero de 2010 al 31 de diciembre de 2010, en el Laboratorio de Química Forense con sede en Texcoco.

Marco teórico:

LÍQUIDO SEMINAL

1. Concepto

El semen es un líquido blanco amarillento, espeso, secretado por los testículos y los órganos reproductores masculinos accesorios, consta principalmente de espermatozoides suspendidos en el plasma seminal¹.

2. Órganos que participan en la elaboración del semen

El semen es un líquido que contiene en suspensión a los espermatozoides. Los espermatozoides se producen en el testículo en dos etapas que duran unos 60 días:

1. La espermatogénesis: se refiere a la producción de las espermátidas a partir de las células madre.
2. La espermiogénesis, que consiste en la modificación morfológica de la espermátida en espermatozoide, con formación particularmente del acrosoma y del flagelo.

Así se individualizan las diferentes partes del espermatozoide:

- Cabeza, que contiene el núcleo, culminada con el acrosoma:
- Pieza intermedia
- Flagelo

En los **testículos**, los espermatozoides son inmóviles o móviles *in situ* y no fecundantes. Son evacuados hacia el epidídimo por los conductos espermáticos intratesticulares (túbulos rectos, *rete testis*).²

El **epidídimo** está constituido de tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola. En este se produce al mismo tiempo reabsorción y secreción epididimaria, sólo aquí los espermatozoides adquieren su movilidad progresiva y su aptitud para la fecundación. Como la secreción de los espermatozoides entre dos eyaculaciones es continua, son almacenados en la cola del epidídimo.²

En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo que contiene los espermatozoides es expulsado por el **conducto deferente** que acaba en la **ampolla deferente**, después pasa por los **conductos eyaculadores** hasta la **uretra prostática**. A esta altura se añade la secreción **prostática**.²

Luego, en un segundo tiempo, al contraerse las **vesículas seminales**, se descarga su secreción en los conductos eyaculadores.

En total, el volumen de espermatozoides representa el 5% de la secreción epididimaria, el 30% es de secreción prostática y el 65%, la secreción de las vesículas seminales².

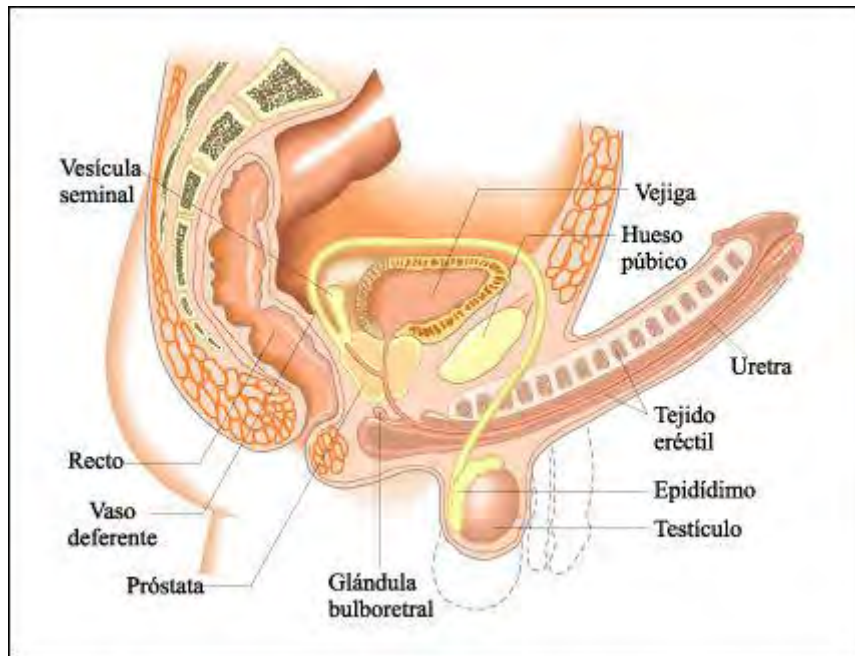


Figura No.1 Anatomía del aparato reproductor masculino, imagen tomada de Curtis Helena, Biología, 2008.³

El aparato genital normal de los seres humanos tiene un epitelio que es una capa mucosa constituida por células epiteliales de transición, cilíndricas y pavimentosas. Las diversas especies de bacterias comensales colonizan estas superficies, no causan daño al huésped, excepto bajo circunstancias anormales, y ayudan a evitar la adherencia de los microorganismos patógenos.³

3. Biota microbiológica del tracto genital masculino

A continuación se menciona la biota microbiana del tracto genital masculino dependiendo del sitio anatómico de dicho aparato:

Tabla No.2 Biota microbiana del tracto genital masculino

Sitio anatómico	Biota comensal
Ultimo tercio de la uretra masculina y meato	Cocos grampositivos, Diferoides y anaerobios
Pene por debajo del prepucio	<i>Mycobacterium smegmatis</i> , otras bacterias grampositivos
Resto del Tracto genitourinario normalmente estéril	

Cuadro realizado a partir de datos de Forbes, Betty, 2004³ y, de A. Pumarola, Microbiología y Parasitología Medica 1987²⁶

4. Propiedades Fisicoquímicas del Esperma

4.1 Propiedades físicas

- El volumen de un eyaculado después de un lapso de abstinencia de 3 a 5 días es de 2 a 6 mL.
- El esperma presenta aspecto límpido, color blanquecino y consistencia viscosa.
- Coagula espontáneamente *In vivo* en la vagina, lo mismo que *in vitro* y luego se licua en 20-30 min a 37°C.
- El pH del esperma es neutro entre 7.2 y 7.8, lo cual resulta de la mezcla de la acidez prostática y de la alcalinidad vesicular.²

4.2 Composición Química

El plasma seminal es un medio rico y complejo que sirve como vehículo, medio nutritivo y protector de los espermatozoides.²

Se encuentra constituido por:

Minerales: Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺

Glúcidos: poca glucosa (0.39 mmol/mL) sobre todo fructosa (de 5.5 a 27 mmol/L fuente de energía para los espermatozoides) producida a partir de la glucosa sanguínea:

- Ácidos Orgánicos: son numerosos en particular:
 - Ácido cítrico que contribuye al mantenimiento de la presión osmótica del esperma.

- Ácido ascórbico protector de los espermatozoides contra los radicales libres.
- Lípidos: tres veces menos que en el plasma sanguíneo:
 - Colesterol
 - Glicerofosforilcolina
- Esteroides
 - Testosterona
 - Dehidroepiandrosterona (DHEA)
- Constituyentes de pequeña masa molecular:
 - Aminoácidos
 - Carnitina: papel importante en el metabolismo de los espermatozoides bajo la forma de acetilcarnitina
 - Espermidina.
 - Espermina: es responsables de olor del esperma (oxidación) y es utilizada en medicina legal para identificar rastros de esperma (cristales de Charcot)
 - Glutatión: protector de los espermatozoides por su poder reductor
- Proteínas: concentración inferior a la del suero sanguíneo con un perfil electroforético que muestra un reparto muy diferente de las fracciones²:
 - Albumina = 6.3%
 - α globulina = 15.9%
 - β globulina = 41.1%
 - γ globulina = 23.2%
 - Fracciones que no migran = 13.5%
- Más de 50 actividades enzimáticas: Hidrolasas (fosfatasa ácida, α_1 , α_4 glucosidasas, etc.)
- Prostaglandinas.²

5. Fracciones del volumen total del semen

1) La Fracción Pre-eyaculatoria (10% al 15% del volumen total): Procede de las secreciones de las glándulas de Cowper y de Litré. Este líquido se descarga por la uretra por estímulo erótico, es de consistencia mucosa, transparente y no presenta espermatozoides. La función de esta fracción es hacer más resbaladizo el canal de la uretra (lubricante).⁴⁻⁵

2) La Fracción Previa o prostática (13% al 33% del volumen total): Proviene de la próstata, es fluida, no presenta espermatozoides. Tiene una elevada concentración de fosfatasa ácida, gama-glutamiltanspeptidasa y ácido cítrico.⁴⁻⁵

3) La Fracción Principal (5% al 10% del volumen total): Procede del epidídimo y de los conductos deferentes, presenta elementos líquidos y gelatinosos. Es la fracción que contiene la mayor cantidad de espermatozoides.⁴

4) Fracción Terminal (50% al 60% del volumen total): Procedente de las vesículas seminales. Es de consistencia gelatinosa o coloide y contiene una considerable cantidad de fructosa.⁴⁻⁵

6. Anatomía y fisiología del espermatozoide

El típico espermatozoide es de aproximadamente 50 μm de largo y consta de una cabeza, parte intermedia y cola. La cabeza es de forma oval y plana, disminuyendo en forma apical. La medida de la cabeza es de 4.0-5.0 μm de longitud, 2.5-3.5 μm de ancho y la longitud de radio 1.50 a 1.75 μm .⁶

El núcleo del espermatozoide compone aproximadamente el 65% de la cabeza y está fabricado con materiales cuidadosamente empaquetados en proteínas básicas y cromosómicas (en gran parte del ADN).⁶

La parte anterior de la cabeza está cubierta por una estructura en forma de saco llamado acrosoma (*galea capitis*, cubierta de cabeza) que contiene las enzimas esenciales para la progresión de los espermatozoides a través de las diferentes capas de células que rodean el óvulo y su zona pelúcida.⁶

La cola es aproximadamente diez veces la longitud de la cabeza, se encuentra incluida dentro de una funda delgada y posee dos fibras centrales dentro de nueve pares de fibras exteriores que comienzan en el cuello y se recorren hacia la punta de la cola.⁶

La pieza intermedia es la porción anterior de la cola y consiste en una envoltura que rodea a las mitocondrias empaquetadas estrechamente. La unión

entre la pieza de la cola y la pieza intermedia se caracteriza por la presencia de un aro llamado “anillo”. En conjunto, las fibras, son impulsadas por las mitocondrias en la pieza intermedia, se llama el complejo de filamento axial, que es el órgano principal de la motilidad de los espermatozoides.⁶

A medida que se desarrollan los espermatozoides en los testículos, la pared de la célula espermática se va eliminando, formándose la membrana plasmática externa y la gota citoplasmática que contiene parte del exceso de citoplasma de la célula espermática. Esta gota es originalmente ubicada en el cuello del espermatozoide, pero se mueve hacia abajo a la parte posterior de la pieza intermedia de los espermatozoides que maduran en el epidídimo. La gota citoplasmática se libera durante la eyaculación, si el espermatozoide ha madurado lo suficiente.⁶

7. Mecanismo de la eyaculación

La eyaculación sucede en dos fases: emisión y eyaculación propiamente dicha.

- a) La **emisión** de semen a la uretra se debe a la contracción de la fibra lisa de las glándulas productoras (próstata, vesículas seminales y bulbouretrales) y del conducto deferente. Los movimientos peristálticos de este conducto llevan los espermatozoides a mezclarse con las secreciones glandulares. El llenado de la uretra se acompaña de un estímulo sexual muy intenso. La contracción de la fibra lisa está regulada por el sistema simpático.⁷
- b) La **eyaculación** es la expulsión final de semen desde la uretra al exterior. Dentro de la uretra, el semen provoca reflejos que incrementan la contracción de los órganos mencionados anteriormente y la contracción espasmódica de los músculos isquiocavernosos y bulboesponjosos, y de otros músculos perineales, con el efecto de la salida del semen acompañada de una sensación sexual especial denominada orgasmo masculino.⁷

En una eyaculación normal hay un volumen de 3-4 mL de semen que contiene entre 200 y 300 millones de espermatozoides.⁷

Tabla No.3 Resumen de la composición del líquido seminal humano.

Color: blanco, opalescente. Densidad: 1.028 pH: 7.35-7.50	
Recuento espermático: En promedio 100 millones por mililitro, con menos de 20% de formas anómalas	Desde las secreción epididimaria (contribuye con 10% del volumen total)
Otros componentes: Fructosa (1.5-6.5 mg/mL) Fosforilcolina Ergotioneína Ácido ascórbico Flavinas Prostaglandinas	Desde las vesículas seminales (contribuye con 60% del volumen total)
Espermina Ácido Cítrico Colesterol, fosfolípidos Fibrinolisisina, fibrinogenasa Zinc Fosfatasa ácida	Desde la próstata (contribuye con 30% del volumen total)
Fosfato Bicarbonato	Amortiguadores
Hialuronidasa	

Cuadro tomado y modificado de Barrett, Ganong Fisiología Médica 2010²²

SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO

1. Generalidades

El sistema reproductor femenino incluye a los órganos productores de gametos, los ovarios. Los ovocitos, a partir de los cuales se desarrollan los óvulos, se encuentran en la capa externa del ovario.⁸

Otras estructuras importantes son los oviductos, el útero, la vagina y la vulva.

El útero es un órgano hueco, muscular, en forma de pera, de tamaño ligeramente inferior al puño y está tapizado por el endometrio. Tiene dos capas principales, una de las cuales es expulsada durante la menstruación, mientras la otra es aquella a partir de la que se regenera la capa eliminada. Los músculos lisos de las paredes del útero se mueven en ondas continuas. El esfínter muscular que cierra la abertura del útero es el cérvix (cuello), por donde pasan los espermatozoides en su camino hacia el ovocito. En el momento del nacimiento, el cuello se dilata y permite la salida del feto.⁸

La vagina es un tubo muscular que comunica el cuello del útero con el exterior del cuerpo. Es el órgano receptivo para el pene y también el canal de parto y su interior es ligeramente ácido.⁸

Los órganos genitales externos de la mujer, el clítoris, homólogo al pene del varón, y los labios, se conocen colectivamente como la vulva. Al igual que el pene, está compuesto principalmente por tejido eréctil. Los labios encierran y protegen las estructuras subyacentes más delicadas (embrionariamente son homólogos al escroto del macho).⁸

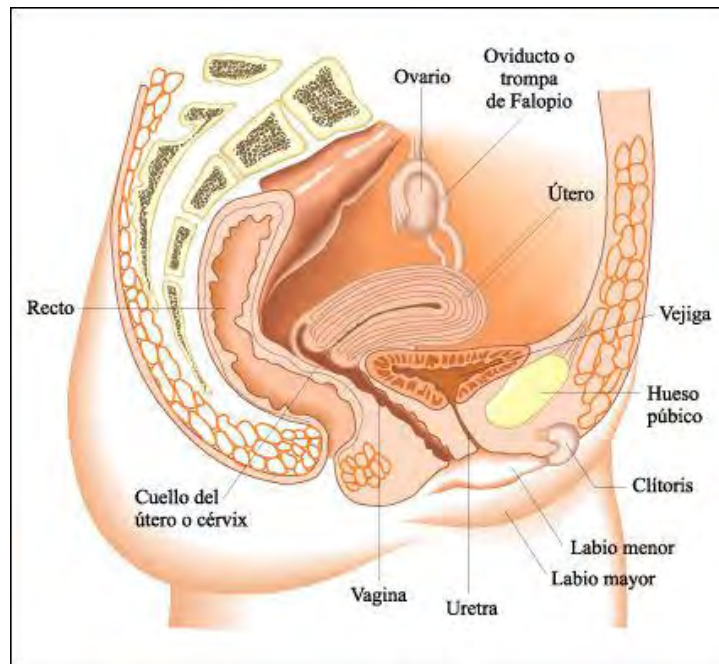


Figura No.2 Anatomía del aparato reproductor femenino, imagen tomada de Curtis Helena, Biología, 2008.³

Es importante familiarizarse con las estructuras anatómicas del aparato genital ya que dependiendo del sitio anatómico se encontrará la biota microbiana, siendo de importancia para el procesamiento adecuado de las muestras y la interpretación de los resultados de laboratorio.³

2. Biota microbiológica del tracto genital femenino

La biota del aparato genital femenino varía con el pH y la concentración de estrógenos de la mucosa, lo que depende de la edad. Las mujeres prepúberes y posmenopáusicas albergan sobre todo estafilococos y corinebacterias (la misma biota presente en la superficie del epitelio), mientras que las mujeres en edad de reproducción pueden albergar cantidades grandes de bacterias facultativas como miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, estreptococos y estafilococos. Los lactobacilos son microorganismos (m.o.) predominantes en las secreciones de la vagina normal y sana. Muchas mujeres presentan estreptococos beta-hemolíticos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*), que pueden transmitirse al recién nacido. Si bien las levaduras (adquiridas a partir del tracto gastrointestinal) pueden estar transitoriamente en el tracto vaginal, no se considera biota normal.³

A continuación se menciona la biota microbiana del tracto genital femenino dependiendo del sitio anatómico de dicho aparato:

Tabla No.4 Biota microbiana del tracto genital femenino

Sitio anatómico	Biota comensal
Uretra	<i>Enterobacteriaceae</i> , Estreptococos del grupo B, especies de <i>Enterococcus</i> , difteroides Estafilococos cóagulasa-negativos, anaerobios
Genitales externos y piel del perineo	Difteroides, Estafilococos cóagulasa-negativos, especies de <i>Micrococcus</i> , levaduras, especies de <i>Acinetobacter</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> ,
Vagina	<i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> *, <i>Streptococcus</i> grupo B, <i>Micoplasmas</i> *, <i>Enterobacteriaceae</i> , especies de <i>Enterococcus</i> , Difteroides, Estafilococos cóagulasa-negativos, anaerobios (varía con la edad).
Endocérvix	Normalmente estéril o escasamente contaminado con biota vaginal
Endometrio, trompa de Falopio, ovarios	Normalmente estéril

Cuadro modificado a partir de datos de Koneman et. al. 2009⁹ Gamino-Arrollo, et. al., 2005*¹⁶ y Forbes, Betty, 2004³

MARCO JURÍDICO

Conociendo el sitio anatómico en el cual se victimiza más al género femenino, y las bases fisiológicas del semen, se tiene como objeto de investigación los rastros de semen y manchas presentes en aquellos delitos cometidos contra la libertad sexual.

Para la determinación y participación del perito químico es de vital importancia conocer los artículos del marco jurídico en donde se aplica e interviene la Química Forense, siendo necesario conocer la normatividad vigente y así ayudar tanto a la propia calificación del delito como al establecimiento del grado de participación de los autores.

Delitos sexuales: Expresión generalmente empleada para referirse a acciones que afectan a personas de cualquier edad y sexo, contra su consentimiento y que perturban su desarrollo sexual. Son conductas reprobadas social y legalmente.

En la legislación de nuestro país, el Código Penal Federal, es la normatividad vigente que se aplica en la República Mexicana, ya que establece los delitos, las penas y medidas de seguridad. En este Código Penal se encuentran los Delitos contra la Libertad y el Normal Desarrollo Psicosexual, definiendo los diferentes delitos de este orden, así como las penas que se señalan en los artículos que a continuación son descritos:

1. Código Penal Federal

El Título Decimoquinto, Capítulo I contempla los Delitos contra la Libertad y el Normal Desarrollo Psicosexual, el cual contiene los siguientes artículos y delitos:

“Hostigamiento sexual, abuso sexual, estupro y violación”

Artículo 259 Bis.- Al que con fines lascivos asedie reiteradamente a persona de cualquier sexo, valiéndose de su posición jerárquica derivada de sus relaciones laborales, docentes, domésticas o cualquiera otra que implique subordinación, se le impondrá sanción hasta de cuarenta días de multa. Si el hostigador fuese servidor público y utilizare los medios o circunstancias que el encargo le proporcione, se le destituirá de su cargo.

Solamente será punible el hostigamiento sexual, cuando se cause un perjuicio o daño. Sólo se procederá contra el hostigador, a petición de la parte ofendida.¹⁰

Artículo 260.- Al que sin el consentimiento de una persona y sin el propósito de llegar a la cópula, ejecute en ella un acto sexual o la obligue a ejecutarlo, se le impondrá pena de seis meses a cuatro años de prisión.

Si se hiciere uso de la violencia física o moral, el mínimo y el máximo de la pena se aumentarán hasta en una mitad.

Artículo 261.- Al que sin el propósito de llegar a la cópula, ejecute un acto sexual en una persona menor de doce años de edad o persona que no tenga la capacidad de comprender el significado del hecho o que por cualquier causa no pueda resistirlo o la obligue a ejecutarlo, se le aplicará una pena de tres a cinco años de prisión.

Si se hiciere uso de la violencia física o moral, el mínimo y el máximo de la pena se aumentarán hasta en una mitad.¹⁰

Artículo 262.- Al que tenga cópula con persona mayor de doce años y menor de dieciocho, obteniendo su consentimiento por medio de engaño, se le aplicará de tres meses a cuatro años de prisión.

Artículo 263.- En el caso del artículo anterior, no se procederá contra el sujeto activo, sino por queja del ofendido o de sus representantes.

Artículo 264.- (Se deroga).

Artículo 265.- Al que por medio de la violencia física o moral realice cópula con persona de cualquier sexo, se le impondrá prisión de ocho a catorce años. Para los efectos de este artículo, se entiende por cópula, la introducción del miembro viril en el cuerpo de la víctima por vía vaginal, anal u oral, independientemente de su sexo.

Se considerará también como violación y se sancionará con prisión de ocho a catorce años, al que introduzca por vía vaginal o anal cualquier elemento o instrumento distinto al miembro viril, por medio de la violencia física o moral, sea cual fuere el sexo del ofendido.¹⁰

Artículo 265 bis.- Si la víctima de la violación fuera la esposa o concubina, se impondrá la pena prevista en el artículo anterior.

Este delito se perseguirá por querrela de parte ofendida.¹⁰

Artículo 266.- Se equipara a la violación y se sancionará con la misma pena:

- I. Al que sin violencia realice cópula con persona menor de doce años de edad;
- II. Al que sin violencia realice cópula con persona que no tenga la capacidad de comprender el significado del hecho o por cualquier causa no pueda resistirlo; y
- III. Al que sin violencia y con fines lascivos introduzca por vía anal o vaginal cualquier elemento o instrumento distinto del miembro viril en una persona menor de doce años de edad o persona que no tenga capacidad de comprender el significado del hecho, o por cualquier causa no pueda resistirlo, sea cual fuere el sexo de la víctima.

Si se ejerciera violencia física o moral, el mínimo y el máximo de la pena se aumentará hasta en una mitad.¹⁰

Artículo 266 Bis.- Las penas previstas para el abuso sexual y la violación se aumentará hasta en una mitad en su mínimo y máximo, cuando:

- I. El delito fuere cometido con intervención directa o inmediata de dos o más personas;
- II. El delito fuere cometido por un ascendiente contra su descendiente, éste contra aquél, el hermano contra su colateral, el tutor contra su pupilo, o por el padrastro o amasío de la madre del ofendido en contra del hijastro. Además de la pena de prisión, el culpable perderá la patria potestad o la tutela, en los casos en que la ejerciere sobre la víctima;
- III. El delito fuere cometido por quien desempeñe un cargo o empleo público o ejerza su profesión, utilizando los medios o circunstancia que ellos le proporcionen. Además de la pena de prisión el condenado será destituido del cargo o empleo o suspendido por el término de cinco años en el ejercicio de dicha profesión;
- IV. El delito fuere cometido por la persona que tiene al ofendido bajo su custodia, guarda o educación o aproveche la confianza en él depositada.¹⁰

2. Código Penal del Estado de México

El Código Penal del Estado de México es la normatividad que se aplica en la entidad del estado, en el subtítulo IV, establece los Delitos Contra la Libertad Sexual, contemplando en los siguientes capítulos y artículos:

- Capítulo I Acoso Sexual, Artículo 269
- Capítulo II Actos Libidinosos, Artículo 270
- Capítulo III Estupro, Artículos 271 y 272
- Capítulo IV Violación, Artículos 273, 273 Bis y 274.²⁸

3. Código de Procedimientos Penales del Estado de México

La intervención del perito aparece regulada en el Código de Procedimientos Penales del Estado de México en la sección V de Pericia e Interpretación en los siguientes artículos del 217 al 237, siendo los siguientes los que lo indican:

Artículo 217.- Siempre que para el examen de personas, hechos u objetos se requieran conocimientos especiales, se procederá con intervención de un perito en la materia, sin perjuicio de que puedan ser dos.

Artículo 220.- La designación de peritos hecha por el Ministerio Público o por el órgano jurisdiccional, deberá recaer en las personas que desempeñen ese empleo por nombramiento oficial.

Si no hubiere peritos oficiales titulados, se nombrarán de entre las personas que desempeñen el profesorado del ramo correspondiente en las escuelas oficiales, o bien de entre los servidores públicos o empleados de carácter técnico en establecimientos o corporaciones dependientes del gobierno, que sean especialistas en la materia de que se trata.²⁹

Generalmente en los delitos sexuales, la presencia de semen se ha considerado como una prueba de la actividad sexual¹¹.

MANCHAS DE SEMEN

El líquido espermático se puede presentar al investigador en cuatro formas distintas: como mancha; impregnado en un tejido; como fluido, mezclado con otros fluidos corporales, como la secreción vaginal, y por último, como semen o líquido espermático.²⁴

1. Búsqueda de indicios

Se va a distinguir entre dos tipos de situaciones:¹²

1.1 Investigación sobre la víctima de agresión sexual

Cuando la agresión se ha producido por vía vaginal o anal se procede a la recolección de la muestra con un hisopo estéril. Se toma con extrema precaución, la muestra de la zona externa en primer lugar y después, de la interna. De esta forma se evita transportar esperma que se encuentre en la zona exterior, al interior.

Cuando la muestra se recoge de la cavidad bucal, se friccionará con un hisopo estéril el interior de las mejillas, la cara interior de los dientes y los espacios interdentes. También se limpiará los labios, la cara, manos, antebrazos, es decir cualquier parte del cuerpo que pueda haber estado en contacto con el esperma. El aspecto que presenta sobre la piel es similar a una mancha de pegamento y si queda adherido a los pelos, dando un aspecto engominado. Al secarse, forma pequeñas escamas blancas en los extremos del pelo.¹²

Las muestras se embalarán en recipientes adecuados sin adicionar conservadores. Deberán ir etiquetadas y se remitirán refrigeradas para impedir su degradación por acción de los microorganismos presentes en las cavidades vaginal, anal y bucal. Es además muy importante recoger la ropa de la víctima y también, si la hay, del sospechoso, sobre la cual también se practicará una búsqueda de indicios.

Se debe evitar siempre enviar ropas que estén húmedas ya que en estas condiciones, se puede acelerar la degradación de las muestras biológicas e impedir el análisis del ADN. Previamente se dejarán secar a temperatura

ambiente. Después se remiten utilizando un envoltorio individual y estéril para cada una de las prendas.¹²

1.2 Búsqueda y recolección de indicios en la escena de un hecho criminal

Como es lógico, el aspecto que presenta una mancha de esperma es distinto según el soporte que la contiene. Sobre los no absorbentes puede aparecer como una película brillante con aspecto barnizado. Tradicionalmente, en los textos de Medicina Legal se describe diciendo que su aspecto es similar a un rastro de caracol. También se pueden formar escamas.

Sobre soportes absorbentes el esperma se extiende formando manchas de forma irregular y de aspecto no homogéneo. Esto se debe a que los restos celulares no difunden por lo que aparecen más concentrados en la zona central y van desapareciendo a medida que se avanza hacia el contorno de la mancha. Este último suele estar bien definido y si el soporte es un tejido, queda con aspecto almidonado.¹²

En la recolección y transporte de los indicios se seguirán las precauciones que a continuación se describen.¹²

2. Levantamiento de muestras.

2.1 Semen líquido:

- Sumergir un hisopo, tela o papel en el semen líquido o aspirarlo con una pipeta de plástico
- Colocar el hisopo, el papel o el líquido dentro de un tubo de ensayo y cerrar.
- Embalar en bolsa de plástico y sellar
- Mantener en condiciones de refrigeración hasta su llegada al laboratorio
- En caso de no ser remitido inmediatamente al laboratorio dejar secar y embalar en bolsas de papel

2.2 Exudado anal:

- Se tomarán dos tipos de muestras: tomar dos hisopos a una profundidad del ano de 4 cm en promedio y dos más de la periferia del ano.
- Humedecer con solución salina, buffer de fosfatos o agua inyectable los aplicadores.
- Etiquetar cada aplicador indicando el orden en el que fue tomada la muestra
- Embalar de manera individual y enviar al laboratorio

2.3 Exudado vaginal:

- Impregnar con solución salina o buffer de fosfatos cuatro aplicadores.
- Tomar dos muestras de fondo de saco.
- Tomar dos muestras de región vulvar.
- Etiquetar cada aplicador indicando el orden en el que fue tomada la muestra.
- Embalar de manera individual y enviar al laboratorio.¹⁷

El material para la toma de muestra de acuerdo al protocolo nacional para toma de muestras, levantamiento de indicios, embalaje y envío para la base nacional de datos genéticos, son los hisopos estériles o aplicadores con punta de algodón. Por lo tanto, para los fines de este trabajo es necesario conocer los componentes del algodón que a continuación se describe:

3. Composición química de la fibra de algodón de los hisopos

La fibra de algodón tiene el siguiente contenido: 95% de celulosa, 1.3% de proteína, 1.2% de ceniza, 0.6% de cera, 0.3% de azúcar, 0.8% de ácidos orgánicos y otros compuestos químicos que constituyen 3.1%. Los productos químicos que no son celulosa de algodón son normalmente localizados en la cutícula de la fibra.¹⁸

Los productos químicos diferentes a la celulosa de algodón están compuestos por proteínas, cenizas, cera, azúcar y ácidos orgánicos. La cera de algodón se encuentra en la superficie externa de la fibra. Esta cera de algodón es principalmente cadenas largas de ácidos grasos y alcoholes cuya función es servir como una barrera protectora de la fibra de algodón. El azúcar representa el 0.3% de la fibra de algodón, que proviene de dos fuentes de la planta de azúcar y azúcar de los insectos. El azúcar de las plantas se produce en el proceso de crecimiento de la planta de algodón, estas consisten en monosacáridos de glucosa y fructosa. Los azúcares de insectos son principalmente por las moscas blancas, esta puede causar rigidez, que puede conducir a problemas en las fábricas textiles. Los ácidos orgánicos se encuentran en la fibra de algodón como los residuos metabólicos, se componen de ácido málico y el ácido cítrico.¹⁸

Los productos químicos diferentes a la celulosa de algodón se eliminan mediante el uso de disolventes selectivos. Algunos de estos solventes son: hexano, cloroformo, soluciones de hidróxido de sodio, solventes no polares, el etanol caliente, y agua potable. Después de la eliminación de todas las sustancias

químicas diferentes a la celulosa, la fibra de algodón es de aproximadamente 99% de celulosa (figura No 3).¹⁸

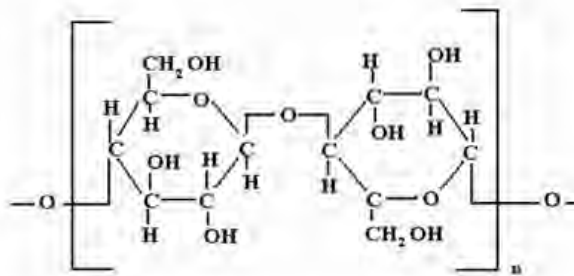


Figura No.3 Estructura Química del Algodón, imagen tomada de Project Cotton, The University of Missouri¹⁸

4. Embalaje:

De acuerdo al tipo de muestra biológica, será requerido un embalaje adecuado como los siguientes:

Las manchas deben ser embaladas en papel individualmente para poder ser transportados al laboratorio, cuando estas se encuentren secas. Podrán ser embaladas en bolsas de plástico las muestras húmedas o mojadas siempre y cuando sean remitidas inmediatamente al laboratorio para evitar su degradación.

Si son líquidas, deben enviarse acompañadas de geles congelados para mantenerlas en condiciones de refrigeración. En el caso de tejidos pueden colocarse en etanol al 70% para su preservación y posterior envío al laboratorio.¹⁷

Las muestras líquidas deben embalarse en recipientes de sello hermético tales como frascos o tubos de plástico o de vidrio con tapón de rosca. Todas las muestras deben identificarse con los siguientes datos:

1. Fecha de toma de la muestra
2. Hora de la toma de muestra
3. Lugar de la investigación
4. Ubicación criminalística de los indicios
5. No. de averiguación previa
6. No. de expediente
7. Indicar el tipo de tejido (área o región anatómica), si es el caso
8. Nombre de la persona que hizo la toma de muestra
9. Nombre de la persona a la que se le tomo la muestra

10. Observaciones.

5. Tensoactivos y sistemas detergentes

El término detergente se utiliza a menudo en vez de tensoactivo. Se usa para designar una sustancia capaz de limpiar, aunque el término detergente también abarca a las sustancias inorgánicas que se utilizan para algún trabajo de limpieza. Con frecuencia el término detergente se refiere a una combinación de surfactantes con otras sustancias, orgánicas o inorgánicas, en una formulación que incrementa la eficacia, en la limpieza específicamente superando al tensoactivo aislado.¹⁹

La clasificación de los surfactantes depende de la carga de la especie tensoactiva. En los tensoactivos aniónicos, esta especie transporta una carga negativa. En los tensoactivos catiónicos, la carga es positiva. En los tensoactivos no iónicos no hay carga en la molécula. Finalmente, en los surfactantes anfotéricos, la solubilización está dada por la presencia de cargas positivas y negativas en las moléculas.

En general, el grupo hidrofóbico está compuesto por una cadena hidrocarbonada que contiene aproximadamente de 10 a 20 átomos de carbono. La cadena puede interrumpirse por átomos de oxígeno, un anillo bencénico, dobles enlaces, y grupos funcionales amida, ésteres u otros.

Dentro de la clasificación de los tensoactivos aniónicos los grupos polares que se encuentran en los surfactantes aniónicos son carboxilato, sulfonato, sulfato y fosfato (Ésteres de fosfato, Figura No.4).

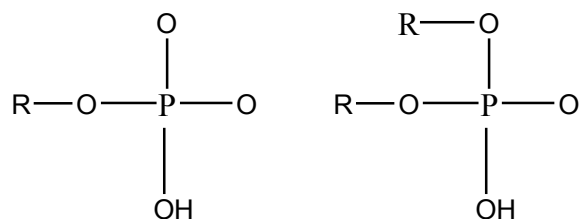


Figura No.4 Ésteres de fosfato. Los mono y diésteres del ácido ortofosfórico son tensoactivos útiles. Imagen tomada Kirk-Othmer. Enciclopedia de Tecnología Química 1998¹⁹

En su forma ácida los ésteres muestran solubilidad limitada al agua; las sales de los metales alcalinos son más solubles. La actividad superficial de los

esteres de fosfato es buena, aunque en general es un poco menos que la de los precursores correspondientes libres de fosfato.¹⁹

6. La Problemática en Muestras de Delitos Contra la Libertad Sexual.

Los DCLS presentan problemas asociados al propio caso que, en muchas ocasiones, permiten prever las dificultades tanto legales como técnicas que se pueden plantear. Desde el punto de vista del laboratorio, las dificultades abarcan la práctica totalidad del proceso desde la toma y remisión de las muestras, la recogida de vestigios, la identificación de presencia/ausencia de semen hasta la individualización del mismo o, en su defecto, de células no espermáticas del agresor.³⁰

Víctima viva.

No por constituir delito deja de ser un mero acto sexual, por lo que las muestras directas son especialmente relevantes. Proceden mayoritariamente de tejidos del epitelio mucoso –zona vaginal, anal y bucal- donde los fluidos de la víctima actúan diluyendo a los del agresor y favoreciendo tanto la pérdida de material seminal, lo que depende, entre otros factores, tanto del tiempo transcurrido entre la comisión del delito y la toma de muestras como de la degradación del mismo desde la toma a la llegada al laboratorio. Por el contrario, en soportes bioquímicamente inertes y secos el material biológico queda adherido, facilitando tanto el análisis químico-inmunológico como la observación microscópica de los distintos tipos celulares y la obtención de un ADN íntegro.³⁰

IDENTIFICACIÓN DE SEMEN

Comprende en pruebas de orientación como: el examen con luz ultravioleta a una longitud de onda de 450 nm, el examen cristalográfico, la concentración de zinc en contenido vaginal, la prueba de la fosfatasa ácida; y pruebas de confirmación: como la Proteína p30 (Antígeno Prostático Específico), examen directo y la tinción.¹¹

1. Pruebas de orientación

1.1 Examen con luz ultravioleta

Una vieja técnica empleada es la luz ultravioleta de onda corta (UV), se utiliza para visualizar semen seco en telas sospechosas, en una prueba positiva se encuentra una fluorescencia característica azul-blanco contra un fondo oscuro. Aunque es fácil de usar, la iluminación UV no es conveniente porque los detergentes impregnados en las telas (por ejemplo, ropa de cama y ropa interior) también fluorescen, enmascarando el semen.²¹

Los científicos forenses dejaron la luz UV en favor de las fuentes de luz alternativa, muchos de los cuales tienen longitudes de onda sintonizables. Utilizando gafas de color ámbar y una longitud de onda de 450 nm, los analistas observan el semen y otras sustancias biológicas como una fluorescencia azul-blanco. La técnica tiene tres ventajas importantes: es rápida, presenta patrones de coloración al visualizarlos, que puede ser importante con respecto a la verificación de las circunstancias del crimen, y también se puede visualizar las manchas de semen en luz y oscuridad.²¹

Una desventaja de las fuentes de luz alternativa es que las sustancias que no sean semen también dan fluorescencia (por ejemplo, la saliva, la orina, así como miles de otras sustancias no identificables). A pesar de que se observe una fluorescencia esta solo es presuntiva para semen, y los otros no son tan brillantes como la de esperma, los analistas inexpertos a menudo analizan todas las manchas fluorescentes, por temor a una falta de reconocimiento del semen. El análisis de todas las manchas fluorescentes genera un trabajo innecesario y una pérdida de tiempo valioso. Después de encontrar una mancha que da una fluorescencia similar al semen, hay que confirmar la presencia de semen. Una prueba rápida presuntiva es la Fosfatasa Ácida realizada en las manchas de relieve por una fuente de luz alternativa a menudo puede descartar las manchas de que no son semen.¹¹

1.2 Examen cristalográfico

Consiste en la identificación de cristales de *colina* y de *espermina*, dos componentes del semen. Para este fin se realizan las pruebas clásicas de *Florence* y de *Barberio*.

1.2.1 Prueba de Florence.

Data de 1895.y es sólo una prueba presuntiva. De acuerdo con un estudio de *Weaver, Lappas y Rowe*, en 1978 se realizaba en aproximadamente un 31 % de los laboratorios de ciencias forenses. No es específica de semen, ya que también puede resultar positiva en manchas de insectos aplastados y en extractos de algunos órganos.¹¹

El reactivo que se emplea en la prueba consiste en:

<i>Yoduro de potasio</i>	1.65 g
<i>Yodo</i>	2.54 g
<i>Agua destilada</i>	30 mL

Al mezclarlo con un extracto acuoso de semen se originan cristales en forma de rombos o de agujas, de tono pardo oscuro, de peryoduro de colina.

La reacción se debe a la colina libre, que es un producto de la degradación de la lecitina, presente en cantidades importantes en los espermatozoides.

Un resultado negativo puede deberse a que la colina es escasa. Un resultado positivo requiere la presencia de espermatozoides para confirmar el diagnóstico de semen, lo cual limita la utilidad de la prueba en los casos de azoospermia.¹¹

1.2.2 Prueba de Barberio.

También ha perdido validez, puesto que sólo permite suponer que la mancha es de semen, sin aclarar si es humano o animal. Por esta razón, sólo tiene valor cuando es negativa, porque esto permite afirmar que la mancha en estudio no es de semen.¹¹

La reacción se produce en pocos minutos al mezclar una solución acuosa o alcohólica saturada de ácido pícrico, con semen fresco o seco. El extracto para la prueba no debe ser muy concentrado.

La reacción se debe a la espermina. Se forman cristales de picrato de espermina, que se presentan como agujas amarillas en forma de rombos, con ángulos obtusos, a veces atravesados longitudinalmente por una línea de refracción. En otras ocasiones, cuando los ángulos se redondean, asumen la forma de cristales ovoides.

Esta prueba puede dar falsos positivos; según el citado estudio de *Weaveret y cois.* (1978), sólo se practica en el 3% de los laboratorios de ciencias forenses.¹¹

1.3 Concentración de zinc en contenido vaginal

Ha sido señalada por *Rogers y cols.* (1988) como un marcador de coito reciente. Normalmente, la vagina contiene de 4 a 15 $\mu\text{g/mL}$ en fluido vaginal.¹² En el semen humano, la concentración de zinc suele ser:

En hombres normales: 195 a 197 $\mu\text{g/mL}$, en oligospermicos: 132 a 140 $\mu\text{g/mL}$ y en azoospermicos: 85 $\mu\text{g/mL}$.¹¹

1.4 Prueba para la determinación enzimática de la fosfatasa ácida

Se basa en el hecho de que la secreción prostática, contiene un porcentaje de fosfatasa acida mayor que en cualquier otro fluido biológico.

1.4.1 Antecedentes

La fosfatasa fue descubierta en 1923, cuando *Robinson*, demostró en el hueso, la presencia de una enzima capaz de hidrolizar el hexamonofosfato de calcio, a la cual se le dio el nombre de fosfatasa.¹¹

Años más tarde, *Kutscher y Webers* descubrieron que en el tejido normal de la próstata humana se encuentran altas concentraciones de esta enzima, cuya actividad óptima se desarrolla a un pH de 4.9.

Durante los años siguientes, se dieron a conocer tres pruebas para demostrar su presencia: en 1949, *Kaye* ofreció una prueba macroquímica, y en 1950 *Walker* presentó otra que aplicaba la técnica histoquímica de *Seligman y Manheimer*, y que se diferenciaba de la *Kaye* porque era independiente de la presencia o ausencia de espermatozoides.

En 1955, *Berg* describió la prueba más utilizada en la actualidad, en la que se emplea una sal de diazonio para producir una intensa coloración púrpura.¹¹

La actividad enzimática de la fosfatasa ácida, puede mantenerse en la vagina hasta doce horas después del coito. En cadáveres, *Standefer* y *Street* han demostrado su persistencia al cabo de siete días en la vagina; treinta y seis horas en la boca, y veinticuatro en el recto. En casos de prostatitis crónica, los niveles de fosfatasa ácida pueden ser bajos.¹¹

Un estudio que se llevó a cabo por el Dr. Ove Riisfeldt en 1946. Encontró valores altos de actividad de la fosfatasa ácida, estos se encuentran en todos los eyaculados con excepción de los sujetos que han sido prostatectomizados. La mayoría de las muestras contenían desde 1500 hasta 3500 U/mL de fosfatasa ácida en el semen, el valor más bajo se observó 400 U/mL.¹⁶

En los siguientes fluidos, productos y especímenes también se encuentra la enzima fosfatasa ácida: las secreciones vaginales y el moco cervical de mujeres normales, los pacientes con gonorrea y la salpingitis, las bacterias (*Pinto*, 1959), la orina de los hombres, mujeres y niños, suero, heces, secreciones, gonorrea masculina, la leche, saliva, jugos gástricos, las lágrimas, el sudor, pus y una serie de bebidas, incluyendo licores de café, té, cacao, cerveza, vino y destilados, todos se probaron que tenían poca actividad de fosfatasa ácida mucho menores a 400 U/mL.

En estos estudios se definió como una unidad de actividad, la cantidad de enzima que libera 1 mg de fenol a partir de fenilfosfato por hora a 37°C a pH 4.9, y la concentración de la enzima se expresó como "por mL de semen"¹⁶

1.4.2 Fundamento de la prueba

Una técnica seria para localizar el semen, es la llamada mapeo de Fosfatasa Ácida, una variante se usa en placa o la prueba en tubo que identifica la presencia de fosfatasa ácida seminal (FAS o FA) en secciones individuales. Un resultado positivo sugiere que el semen podría estar presente. La prueba de confirmación es necesaria.²¹

La fosfatasa ácida seminal se produce en el plasma seminal, porque las células epiteliales secretan la enzima en los elementos del conducto de la próstata. Los niveles de FA son bajos en los hombres antes de la pubertad, el aumento de su nivel máximo en la maduración sexual, no tienen relación con el

recuento de espermatozoides, y no varían en los hombres normospermicos, oligospermia, azoospermia, o la vasectomía.

La técnica para la detección de FA implica el uso de material como: trozos de papel de filtro humedecido con agua destilada estos, trozos se frotran con la mancha a investigar en un patrón reticular (en figura de red o redecilla) o directamente sobre una mancha sospechosa. Si el semen está presente, es muy probable que con una gota de reactivo de fosfatasa ácida colocada en el papel se torne rojo púrpura dentro de 30 segundos. Por otra parte, una pequeña sección o raspado de la mancha se coloca sobre una placa o en un tubo de ensayo, se forma el mismo color característico, el semen está presente. Estos métodos se utilizan para localizar las zonas en las prendas de gran tamaño o sábanas en el cual puede estar presente el semen.²¹

A pesar de que la FA es una enzima relativamente estable, los resultados de pruebas negativas realizadas en los más antiguos elementos probatorios deben ser interpretados con cautela debido a que la enzima pierde actividad a través del tiempo. En general, el tiempo, calor y humedad, mas las condiciones de almacenamiento sean más prolongadas, más corta es la media vida de la enzima. Sensabaugh observó que las manchas de semen seco y se almacena a -20°C mantiene una completa la actividad de FA después de un año, los almacenados a 37°C pierde la mitad de su actividad de FA en los 6 meses, y los almacenados vía húmeda la vida media se redujo a 2-3 meses.²¹

El ensayo de FA consiste en un apropiado sustrato para la enzima, por lo general p-nitrofenilfosfato (PNPP), alfa naftilfosfato o monofosfato de timolftaleína disuelto en un tampón apropiado ácido (acetato, citrato, o Tris-HCl), la fosfatasa ácida hidroliza el sustrato, liberando el grupo fosfato de la parte orgánica, y detectando los derivados para formar una producto coloreado con reactivos reveladores. Una formación rápida de color indica que el semen está presente.¹²⁻²¹

Hay que recordar, la mayoría de los líquidos, incluyendo las secreciones vaginales, contienen FA, y la prueba de presunción que no los distinguen. En las muestras vaginales post mortem, puede estar presente FA termoestable, el cual puede estar como falsa predicción de la presencia de semen.²¹

Tabla No.5 Procedimiento típico para la realización de una prueba cualitativa de la presencia de FA.

Preparación del reactivo.

Buffer: 8.21g de acetato de sodio anhidro; pH 5.5

Reactivo 1: Disolver 5mg de fosfato de alfa-naftilfosfato en 5 mL de tampón.

Reactivo 2: Disolver 5mg de azul rápido B en 5 mL de tampón.

Preparar un solo reactivo, añadiendo volúmenes iguales de los reactivos 1 y 2.

Procedimiento

Realice la prueba en una parte de la mancha, un extracto o pasar un paño sobre la zona sospechosa. Siempre pruebe un control sin sustrato y un control positivo, al mismo tiempo que las muestras desconocidas.

Método en dos pasos.

Aplique una gota de la solución de alfa-naftilfosfato, reactivo 1, a la muestra desconocida y espere 60 segundos. Aplique una gota de la solución azul B rápido, el reactivo 2, a la muestra desconocida. Un color púrpura inmediato es una reacción positiva

Método en un solo paso.

Aplique una gota de los reactivos combinados 1 y 2 a la muestra desconocida. Un color púrpura que se desarrolla dentro de los primeros 60 segundos es una reacción positiva.

1) Principio de la Prueba

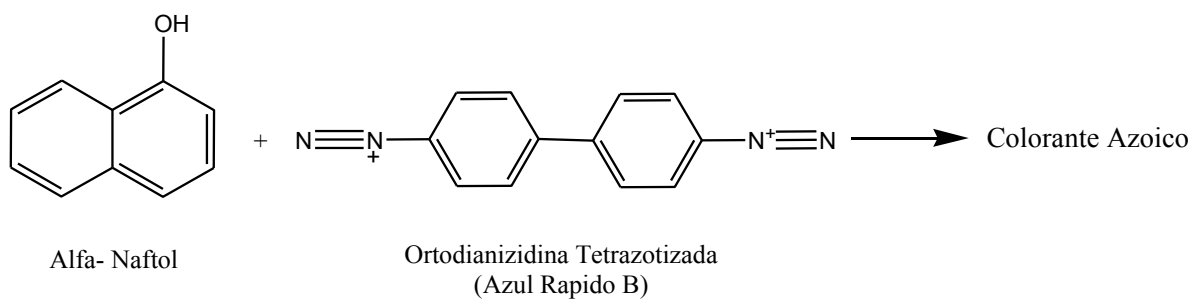
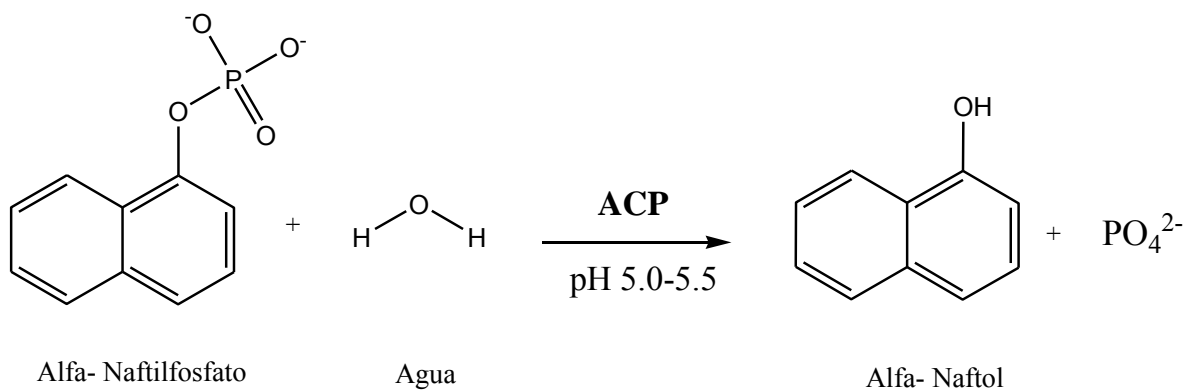


Figura No.5 Secuencia de formación del colorante azoico

Formación del colorante azoico

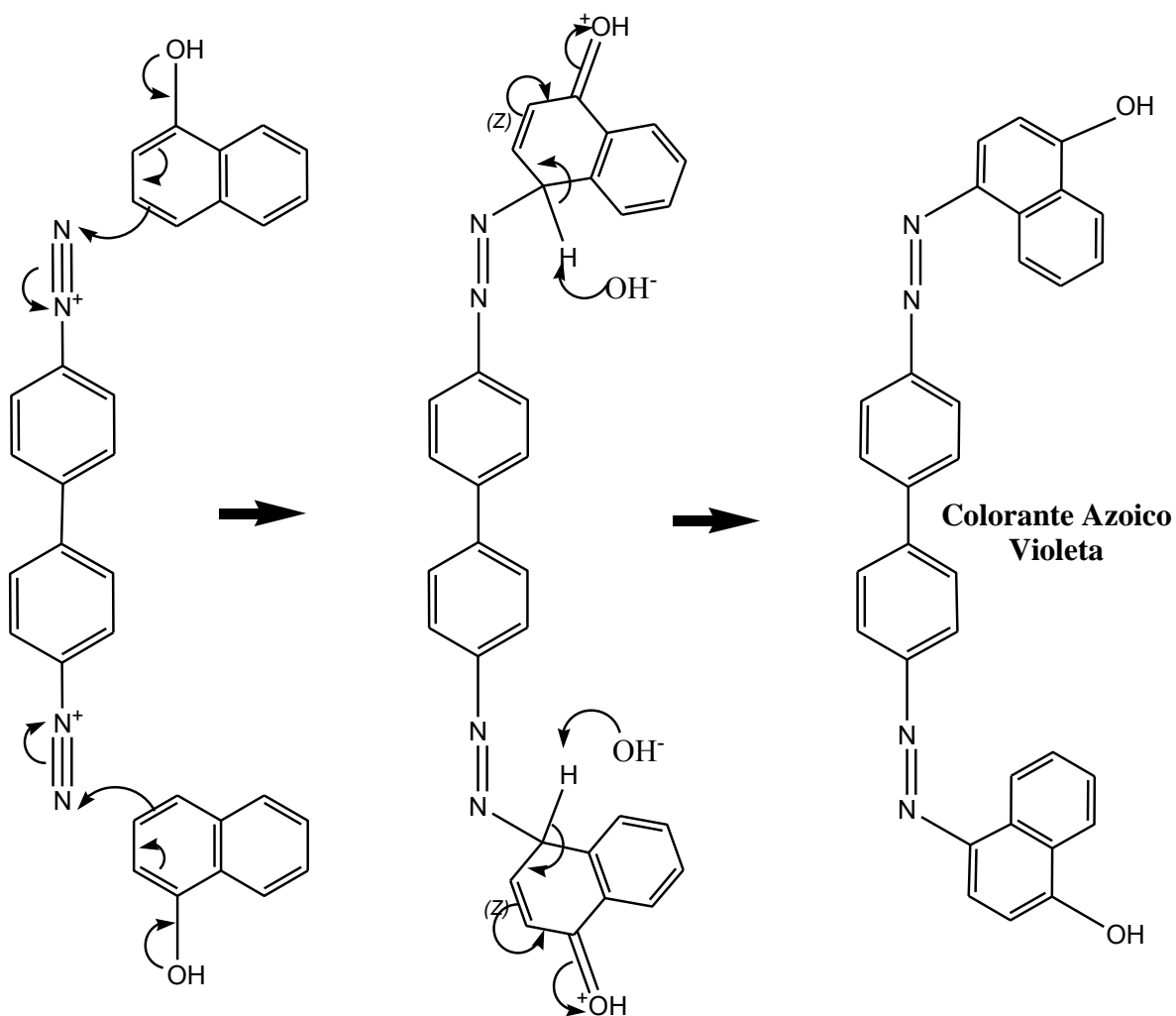


Figura No.6 Mecanismo de reacción de la formación del colorante azoico. Mecanismo de reacción propuesto y basado en McMurry John, Química Orgánica²⁷

2. Bioquímica de la Enzima Fosfatasa Ácida (ACP) Y Fracción Prostática (PAP)

Nombre: Monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa (ácida): ACP¹³

Enzima número: EC 3.1.3.2¹³

Peso Molecular: Aproximadamente 100 000 Daltons, varía en isoenzima¹³

pH óptimo: 5.0-5.5¹³

Se conoce con el nombre de Fosfatasas Ácidas (ACP) a un grupo de fosfatasas no específicas que presentan su máxima actividad alrededor de un pH de 5,0 y catalizan la hidrólisis de un monoéster ortofosfórico, dando un alcohol y un nuevo éster fosfórico.

Distribución en los tejidos

Se origina principalmente en el hígado, posiblemente en el bazo y se encuentra en una amplia variedad de tejidos, como eritrocitos, epitelios glandulares de próstata y testículo, en riñón, pulmón, bazo, vejiga, hígado, páncreas y aorta.¹⁴

Químicamente se han identificado varias isoenzimas, 3 de ellas en la próstata, pero con especificidad solamente una. Isoenzima 2 que se conoce con el nombre de Fosfatasa Ácida Prostática (PAP).

Se encuentra localizada en las vesículas y vacuolas citoplasmáticas de los componentes celulares del epitelio glandular a nivel del retículo endoplásmico.

Normalmente su producción es mínima y la mayor parte es vertida directamente al semen y orina.¹³⁻¹⁴

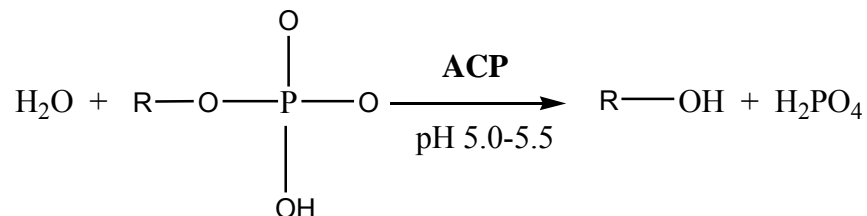


Figura No.7 Reacción general de la fosfatasa ácida. Imagen tomada de Sánchez Rodríguez Martha A. Enzimología Clínica 2005¹³

Inhibidores

Las isoenzimas, eritrocítica y prostática son inhibidas por Calcio y Magnesio, así como Flúor. El tartrato inhibe la enzima de origen prostático, pero no la eritrocítica; mientras que el formaldehído tiene el efecto contrario. El EDTA y el citrato no afectan a la enzima pero el oxalato sí.¹³

3. Pruebas de confirmación

3.1 Examen Directo

Consiste en la observación microscópica de la mancha sospechosa entre portaobjetos y cubreobjetos. Su objetivo es identificar espermatozoides, enteros, o cabezas con restos de cola.¹¹

Los espermatozoides, conservan su movimiento en la vagina durante un periodo promedio de cuatro a seis horas; en el conducto del cuello y en la cavidad del cuerpo del útero, persiste esta condición hasta cuarenta y tres horas después de la eyaculación. *Woodling y Kossoris* (1981) citan un periodo excepcional de diecisiete días, en que se encontraron espermatozoides móviles en el conducto cervical.¹¹

En la mujer hay varios factores que influyen en la motilidad de los espermatozoides. Entre los días catorce y dieciocho del ciclo menstrual, la motilidad se mantiene durante más tiempo; por el contrario, las infecciones vaginales como las candidiasis y la tricomoniosis la disminuyen, lo mismo que los anticuerpos antiespermatozoides que se producen en mujeres que frecuentemente tienen relaciones sexuales con hombres diferentes.¹¹

Se han encontrado espermatozoides, inmóviles en la vagina de occisas, durante periodos que varían según los autores de que se trate. Así, *Wilson* los halló entre ochenta y cinco horas, y dieciséis días después del fallecimiento; *Starostin y Aisberg*, hasta setenta y siete días en vagina, y cuarenta días en la boca.

Para efectos prácticos, conviene aplicar el criterio de *Parikh*; quien recomienda seguir esta interpretación al analizar el contenido vaginal de la mujer viva:

- a) Espermatozoides móviles: eyaculados tres horas antes.
- b) Espermatozoides inmóviles: eyaculados veinticuatro horas antes.¹¹

3.2 Tinción.

Consiste en aplicar colorantes para teñir los espermatozoides a fin de destacar su forma y dimensiones. Las cabezas miden de 4 a 5 μm ; el cuello y la cola, alrededor de 50 μm . Las sustancias empleadas son el *azul de metileno*, que los tiñe de azul-violeta; la *eosina*, que les provee un rojo brillante, lo mismo que la *eritrosina* o *alizarina roja*.¹¹

La mayoría de los laboratorios forenses modernos hidratan el semen seco con una solución acuosa y después colocan una alícuota de la parte del extracto hidratado en un portaobjetos de microscopio, se fija con calor, y después se tiñen las células inmovilizadas con la tinción llamada "Árbol de Navidad" o "Christmas Tree". Históricamente, numerosos métodos de tinción se han utilizado para visualizar los espermatozoides, pero los químicos forenses han tomado la tinción Christmas Tree, la cual fue desarrollada específicamente para el propósito de ayudar en la identificación de los espermatozoides. Este reactivo tiñe la parte anterior de las cabezas de los espermatozoides de color rojo o rosado, la parte posterior cabezas de color rojo oscuro y la pieza intermedia de los espermatozoides se tiñe de azul. La cola de los espermatozoides se tiñe color amarillento verdoso. En muestras en la cual se encuentre ausente la cola del espermatozoide, en la tinción se puede diferenciar la cabeza de la cola, siendo la cabeza suficiente para la identificación de esperma. Las células epiteliales se tiñen de verde a azul-verde.²¹

Siempre parece haber una cierta discusión sobre si el hallazgo de cabezas de espermatozoides es suficiente para concluir si el semen está presente. Por definición, si la cabeza del espermatozoide está presente en la muestra, el semen está presente. La pregunta es si realmente el químico forense está satisfecho con la identificación de espermatozoides realizada. Esto es sobre todo una cuestión de experiencia, sin embargo, el patrón de tinción de árbol de navidad debe ser suficiente para el científico que toma esa decisión.²¹

3.3 Antígeno Prostático Específico (p30)

Ha sido estudiada por *Sensabaugh*, que nombró a la proteína P30 (debido a su aparente peso molecular 30,000 Daltons) quien la considera un marcador específico de semen, producido por la próstata. Es demostrable por inmunoensayo. Según este autor, puede emplearse en combinación con la fosfatasa ácida para confirmar la presencia de semen en individuos azoospermicos.¹²⁻²¹

Finalmente es una forma confiable de identificación de semen en la ausencia de espermatozoides. El antígeno prostático específico, p30, varía en función de la concentración de aproximadamente 300 a 4,200 ng/mL en semen. Se encuentra en el suero de los varones normales libres de cáncer en aproximadamente 0.0026 $\mu\text{g/mL}$: y es estable en las manchas secas de semen durante períodos prolongados.²¹

En la actualidad se le denomina, como gamma seminoproteína y como PSA (antígeno específico de la próstata). En el trabajo original de Sensabaugh, la concentración de p30 en el semen humano normal se determinó a través de la técnica de inmunodifusión radial cuantitativa. La concentración media encontrada fue de 1,92 mg/mL, con un límite de 0,24 a 5,5 mg/mL (n= 17); incluso, en el límite más bajo, la p30 se presenta a niveles fácilmente detectables.²⁴

Varios métodos inmunológicos son utilizados para identificar P30 de hisopados vaginales o extractos de las manchas, los métodos incluyen: inmunodifusión radial, contador o cross-over de la electroforesis, inmunolectroforesis en cohete, radio inmunoensayos y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La sensibilidad por lo menos de estos, inmunodifusión radial, tiene un límite de detección de p30 de aproximadamente 5 $\mu\text{g/mL}$. La prueba ELISA detecta tan solo 0.005 ng/mL, con un límite de corte de 2 ng en hisopados rectales, debido a reacciones cruzadas y puede detectar semen diluido un millón de veces.²¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En los casos en donde está involucrado, la perturbación de la libertad sexual, surge de inmediato la necesidad de poder establecer si se encuentran indicios o evidencias relacionadas con el intercambio de fluidos biológicos del agresor a la víctima y viceversa.

En donde surge la necesidad de contar con técnicas y/o métodos químicos que puedan auxiliar a la investigación, y una de las especialidades de la química es la química forense, que puede dar resolución al cuestionamiento, realizado por parte del ministerio público, en donde se identifica y determina, tanto la actividad enzimática de la fosfatasa ácida de origen prostático, así como la visualización de células espermáticas, siendo estas técnicas, las primordiales para la búsqueda de fluido seminal. Ya que al momento de realizar estas pruebas, se han observado en algunos casos, resultados del tipo falsos positivos, esto debido tal vez a múltiples variables.

Dada la importancia de las pruebas antes mencionadas, ya que se carece de estudios previos, que den una sustentación científica de los factores que afecten a dichas pruebas, es necesario, identificar y estudiar las posibles interferencias que afecten el resultado obtenido, para la determinación de la fosfatasa ácida de origen prostático.

Los factores, que se cree pueden conllevar a la interpretación de un resultado falso-positivo son: las condiciones de embalaje, el tiempo transcurrido entre la toma y su análisis, el material que se emplea para la toma de muestra, los reactivos así como la biota vaginal presente en la muestra, es por lo anteriormente expuesto y a la escasez de información concisa que surge la necesidad de realizar el siguiente trabajo.

OBJETIVOS:

6.1 Objetivo general:

Evaluar los factores físicos tales como el embalaje, intervalo de tiempo entre la toma de muestra y su análisis, el material para la toma de muestra, así como los factores químicos entre los que se encuentra la interacción de los reactivos de la prueba con detergentes y finalmente los factores microbiológicos que pueden producir la enzima fosfatasa ácida, interfiriendo en la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida prostática.

6.2 Objetivos particulares:

1. Determinar el tiempo de reacción de la prueba de fosfatasa ácida en muestras obtenidas de víctimas de delitos sexuales.
2. Evaluar la prueba de la fosfatasa ácida en:
 - a. Los diferentes materiales para la toma de muestra, eligiendo así cuál es la mejor para la misma.
 - b. Los diferentes embalajes, determinando así cuál es el mejor para la preservación de las muestras.
3. Evaluar si el detergente, interacciona con el reactivo de fosfatasa ácida.
4. Aislar e identificar la carga bacteriana a partir de muestras de exudado vaginal de víctima de delitos sexuales.
5. Determinar si los microorganismos aislados e identificados interaccionan con el reactivo de fosfatasa ácida y en que concentración.

HIPÓTESIS:

Si se conocen y evalúan los posibles factores físicos, químicos y microbiológicos, que pueden interferir en la determinación de la fosfatasa ácida, se podrá entender, como afectan estos el resultado final de la prueba, y así se podrá estar en condiciones de sugerir o inferir, según sea el caso, de las condiciones y características que deben de tener las muestras que serán analizadas en su momento, y a su vez, proponer mecanismos o técnicas que tengan como finalidad la disminución de resultados adversos a lo esperado,

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Tipo de estudio: Observacional, Transversal, Descriptivo y Prolectivo

Población de estudio: 45 Muestras de exudado vaginal de víctimas relacionadas con delitos sexuales, remitidas al laboratorio de química forense.

Criterios de inclusión: Mujeres relacionadas con delitos sexuales.

Criterios de exclusión: Aquellos que no cubran el rubro anterior

Diseño estadístico: Descriptivo.

Variables:

Independientes:

- Concentración de células espermáticas
- Cantidad de carga bacteriana vaginal
- Material para la toma de muestra
- Tipo de embalaje
- Concentración de detergente

Dependientes:

- Presencia de la enzima fosfatasa ácida
- Tiempo de reacción de la fosfatasa
- Carga espermática observada

METODOLOGÍAS:

1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

1.1. Preparación de la solución de trabajo:

A. Solución para la determinación de fosfatasa ácida:

a. Solución "A"

- i. ortodianizidina tetrazotizado.....1 g
- ii. acetato de sodio.....20 g
- iii. ácido acético.....10 mL
- iv. agua destilada.....100 mL

b. Solución "B"

- i. Alfa naftil fosfato de calcio.....0.8 g
- ii. Agua destilada.....10 mL

Mezclar 10 mL de la solución "A" y 1 mL de la solución "B", aforar a 100 mL con agua destilada, filtrar y probar usando un control positivo; a esta solución se le conocerá como la solución de trabajo.

Notas:

Todos los reactivos preparados deben mantenerse en refrigeración, las soluciones "A" y "B" suelen tener una caducidad de 3 meses.

1.2. Procedimiento de la técnica de Fosfatasa

1. Desembalar los hisopos con muestra de exudado vaginal.
2. Se procede a trabajar la muestra colocándola sobre un trozo de papel.
3. Se le agregan unas gotas de la solución de trabajo contando el tiempo desde que se agrega el reactivo hasta que se desarrolla el color violeta.
4. El cambio de color violeta se produce en pocos segundos (intervalo de 1 minuto), siendo positiva para la prueba, en caso contrario en que no se observara dicho desarrollo se anotara como negativo
5. Siempre debe realizarse la reacción con un blanco y un testigo positivo, si es posible, para checar la eficiencia del reactivo.

1.3. Preparación de colorantes de tinción para la visualización de espermatozoides.

Presentan:

Alatraste Solano Edgar, Buendía Rodríguez Leslie Viridiana.

A. Colorante rojo nuclear:

Disolver 2.5 g de sulfato de aluminio en 100 mL de agua destilada caliente y agregar 75 mg de rojo nuclear, una vez disuelto todo el contenido, filtrar.

B. Colorante índigo carmín:

Pesar 1.3 g de ácido pícrico, disolver en 100 mL de agua destilada y agregar 0.33 g de índigo carmín, una vez disuelto todo el contenido filtrar.

Notas:

- 1.- Es recomendable mantener los reactivos en refrigeración, una vez que hayan sido utilizados.
- 2.- No exponerlos a la luz durante mucho tiempo.

1.4. Metodología para la realización del frotis y tinción:

- a) Tomar un portaobjetos limpio, realizar una extensión de la muestra sobre el mismo, dejar secar y fijar mediante calor.
- b) Una vez que se tiene fijado el frotis, se coloca sobre una caja petri y se añade el colorante rojo nuclear y se deja reposar durante 10-15 minutos.
- c) Transcurrido el tiempo, se enjuaga con agua destilada durante 5 segundos
- d) Se añade el colorante índigo carmín y se deja reposar 15-30 segundos.
- e) Finalmente se decolora con etanol absoluto, se deja secar y se observa al microscopio a 40X.
- f) Realizar la cuantificación y descripción de los espermatozoides observados

1.5. Preparación de la solución de trabajo.

Se obtiene una muestra de semen en condiciones normales y se prepara una solución 1:100 del mismo. Para ello se tomar 1mL de semen y aforar a 100 mL con solución salina fisiológica. Después se realizó un conteo de con ayuda de un hemocitometro para cuantificar la carga espermática.

Nota: Se obtuvo una carga espermática de 136 500 000 espermatozoides/mL

2. Factores físicos que intervienen en la determinación de la prueba de la fosfatasa ácida.

Se determinó el tiempo de reacción para la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida.

2.1. Metodología para la evaluación del material para la toma de muestra (hisopos y/o cotonetes):

1.- Se evaluaron tres marcas diferentes de hisopos estériles, así como también tres marcas distintas de cotonetes.

2.- Se evaluaron poblaciones de 10 hisopos y la misma cantidad de cotonetes.

3.- Ambas poblaciones de hisopos y cotonetes, fueron sometidos a la reacción de fosfatasa ácida.

4.- Se realizó un registro de los tiempos de reacción de cada hisopo y cada cotonete al que se le agregó el reactivo de fosfatasa ácida.

2.2. Evaluación del embalaje:

Características de la muestra, esta fue una muestra positiva para fluido seminal y con una carga de esperma de un sujeto normal (clínicamente sano)

Embalajes analizados:

- Sobres de papel
- Bolsas de plástico
- Tubos de ensayo

Una vez evaluado qué material para la toma de muestra es el ideal para dicho fin, se eligieron los hisopos para evaluar el tipo de embalaje.

2.3. Metodología para la evaluación del embalaje:

Los siguientes pasos se realizaron para los 3 embalajes analizados.

1.- Se impregnaron por capilaridad 0.2 mL con una solución de semen a cada uno de los 50 hisopos con una pipeta graduada de 1 mL de 1/10 y se embalaron.

2.- Se realizaron 10 grupos de 5 hisopos cada uno, a estos grupos se les identificó con letras alfabéticas (A, B, C,...J), y después fueron sometidos a la reacción de la fosfatasa ácida cada 12 horas llegando hasta el tiempo de 120 horas.

Nota: el almacenaje se realizó a Temperatura ambiente.

3.- Los resultados obtenidos fueron registrados en el formato para el reporte de resultados de la evaluación del embalaje (Tabla No.6)

4.- A cada muestra analizada se le realizó un frotis y con su respectiva tinción, descrita en el apartado número 1.4 metodología para la realización del frotis y tinción de la preparación de reactivos.

5.- Una vez realizada la lectura de los frotis, se registraron los datos obtenidos de la cuantificación y descripción de los espermatozoides observados en la Tabla No.6:

Tabla No.6 Formato de tabla para el reporte de resultados de la evaluación del embalaje

No. de muestra		1				2				3				4				5				
Grupo	Tiempo (h)	Espermatozoides observados																				
		Preparación de las muestras y embalajes																				
		t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	
A	12																					
B	24																					
C	36																					
D	48																					
E	60																					
F	72																					
G	84																					
H	96																					
I	108																					
J	120																					

t= Tiempo de reacción de la fosfatasa ácida
 SPZ= Total de espermatozoides visualizados
 C= Cabezas de espermatozoides visualizados
 CC= Espermatozoides con cabeza y cola visualizados

3. Estudio de la influencia de los factores químicos para la técnica de orientación de la fosfatasa ácida

3.1. Metodología para la determinación de la interacción de detergentes en la prueba de la fosfatasa ácida.

Para este fin, se evaluaron 3 marcas comerciales de detergentes.

1.- Una vez seleccionadas las tres marcas a analizar, se procedió a realizar diluciones de los mismos en las cuáles se empezó por emplear el detergente concentrado, posteriormente se realizaron diluciones de 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000

2.- Con cada una de las concentraciones, se fue humedeciendo un fragmento de tela de algodón de color blanco de 5x5 cm, con cada una de las diluciones, dejando secar y posteriormente se realizó la prueba de la fosfatasa ácida

3.- Se evaluó el tiempo de reacción en la tela con respecto a las diferentes concentraciones de detergentes.

4. Factores microbiológicos que intervienen en la determinación de la fosfatasa ácida.

Evaluación microbiológica para el estudio de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida.

4.1 Metodología para el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las muestras de exudado vaginal.

I.- Aislamiento de microorganismos

1. Después de la determinación del Tiempo de Reacción de la enzima fosfatasa ácida de muestras remitidas al Laboratorio de Química Forense, se eligieron muestras al azar.
2. Se inoculó el hisopo o cotonete de la muestra de exudado vaginal obtenida de la presunta víctima en un caldo nutritivo, Agar Sangre de Carnero al 5%(ASC5%), Agar Chocolate (ACh) y Biggy en condiciones de esterilidad.

3. Se trasladaron los cultivos al Laboratorio de Análisis Clínicos Zaragoza.
4. Se tomó una asada del caldo y se sembraron en los diferentes medios de cultivo como: Sal y Manitol, Eosina Azul de Metileno(EMB), Chocolate, Sangre, Biggy, por estría en 3 o 4 cuadrantes.
5. Se incubaron a 37°C en condiciones aerobias y se realizaron observaciones a las 24 y 48 horas
6. Se realizó un subcultivo para obtener unas cepas puras. Esto se realizo por cada muestra problema, todo esto realizado en un periodo de 3 meses

II.-Identificación de microorganismos

1. Se realizaron las diferentes pruebas
 - Microscópicas
 - Tinción de Gram,
 - Morfología colonial
 - Pruebas Bioquímicas
 - TSI
 - SIM
 - LIA
 - Citrato de Simmons
 - Urea
 - Fenilalanina
 - Caldos Rojos de Fenol con diferentes Carbohidratos
 - Pruebas especiales
 - Catalasa
 - Cóagulasa
 - Oxidasa
 - Sensibilidad a la Bacitracina.
2. Se realizó un subcultivo (cepario) en tubos con agar Soya Tripticasa y ASC5% para cada uno de estos para la siguiente parte de la metodología

4.2. Metodología para el estudio del efecto de los microorganismos sobre el reactivo de la técnica de fosfatasa ácida

III.- Reto directo de microorganismos con el reactivo de fosfatasa ácida.

Se llevó a cabo la siguiente parte de la metodología realizando una prueba cualitativa para identificar los microorganismos que reaccionen directamente con el reactivo de fosfatasa

1. Se toma con hisopo estéril las bacterias a probar a partir del cepario, antes de realizarlo se atempero al ambiente, sobre un pedazo papel.
2. Se dejo secar el hisopo.
3. Se realizó la técnica de la fosfatasa (establecida anteriormente) sobre el papel.
4. Se anotó en la tabla No.7, el tiempo en cual se observa el desarrollo del color de la reacción (Tiempo de reacción) siendo positiva para la prueba, en caso contrario en que no se observara dicho desarrollo se anotara como negativo.
5. Estos pasos anteriores se hicieron para evaluar cada uno de subcultivos obtenidos de las muestras.

Tabla No.7 Formato para el registro prueba cualitativa relación de m.o. con el tiempo de reacción del reactivo de fosfatasa

Cepa No	Tiempo de reacción		
	Inoculo Ligero	Inoculo Mediano	Inoculo Denso

6. Como las cepas no presentaron un resultado positivo se detuvo esta parte de la metodología, sin llegar a la preparación de los estándares nefelométricos de McFarland y suspensiones microbianas.

RESULTADOS.

1. Factores físicos que intervienen en la determinación de la enzima fosfatasa ácida.

1.1 Evaluación del material para la toma de muestra.

Tabla No.8 Evaluación de hisopos estériles

Marcas de hisopos	Marca A	Marca B	Marca C
No. de muestra	Tiempo de reacción		
1	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Neg	Neg
5	Neg	Neg	Neg
6	Neg	Neg	Neg
7	Neg	Neg	Neg
8	Neg	Neg	Neg
9	Neg	Neg	Neg
10	Neg	Neg	Neg

Se muestran los resultados obtenidos tras realizar la técnica de la fosfatasa ácida sobre hisopos estériles, cuyos tiempos registrados fueron negativos dado que no hubo reacción colorimétrica.

Tabla No.9 Evaluación de cotonetes.

Marcas de cotonetes	Marca A	Marca B	Marca C
No. de muestra	Tiempo de reacción		
1	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg
3	Neg	Neg	Neg
4	Neg	Neg	Neg
5	Neg	Neg	Neg
6	Neg	Neg	Neg
7	Neg	Neg	Neg
8	Neg	Neg	Neg
9	Neg	Neg	Neg
10	Neg	Neg	Neg

Se muestran los resultados obtenidos tras realizar la técnica de la fosfatasa ácida sobre cotonetes comunes, cuyos tiempos registrados fueron negativos dado que no hubo reacción colorimétrica.

1.2 Evaluación del embalaje.

Tabla No.10 Resultado de sobres de papel

No. de hisopo		1				2				3				4				5			
Grupo	Tiempo (h)	Espermatozoides observados																			
		Preparación de las muestras y embalajes																			
		t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC	t	SPZ	C	CC
A	12	14	2	2	0	8	9	9	0	9	19	19	0	9	22	18	4	8	10	10	0
B	24	15	9	9	0	15	5	5	0	16	15	15	0	8	9	9	0	10	0	0	0
C	36	35	16	14	2	Neg	19	16	3	20	19	15	4	17	11	10	1	21	19	19	0
D	48	12	18	18	0	20	8	8	0	15	17	17	0	12	13	12	1	9	15	15	0
E	60	44	10	10	0	28	8	8	0	13	24	20	4	17	12	12	0	12	7	7	0
F	72	Neg	9	9	0	20	7	7	0	10	10	10	0	7	6	6	0	8	12	12	0
G	84	20	5	5	0	18	7	7	0	17	4	4	0	15	9	9	0	14	6	6	0
H	96	Neg	8	8	0	Neg	8	8	0	40	5	5	0	Neg	10	10	0	Neg	9	9	0
I	108	25	4	4	0	Neg	3	3	0	Neg	2	2	0	Neg	8	8	0	Neg	7	6	1
J	120	24	12	8	4	11	7	6	1	11	10	10	0	12	8	8	0	Neg	3	3	0

Se muestran las lecturas registradas tanto para el tiempo de reacción, como para las células espermáticas visualizadas en muestras positivas para líquido seminal colocado en hisopos y debidamente embaladas en sobres de papel durante un periodo de 5 días a temperatura ambiente.

t= Tiempo de reacción de la fosfatasa ácida en segundos

SPZ= Total de espermias visualizados

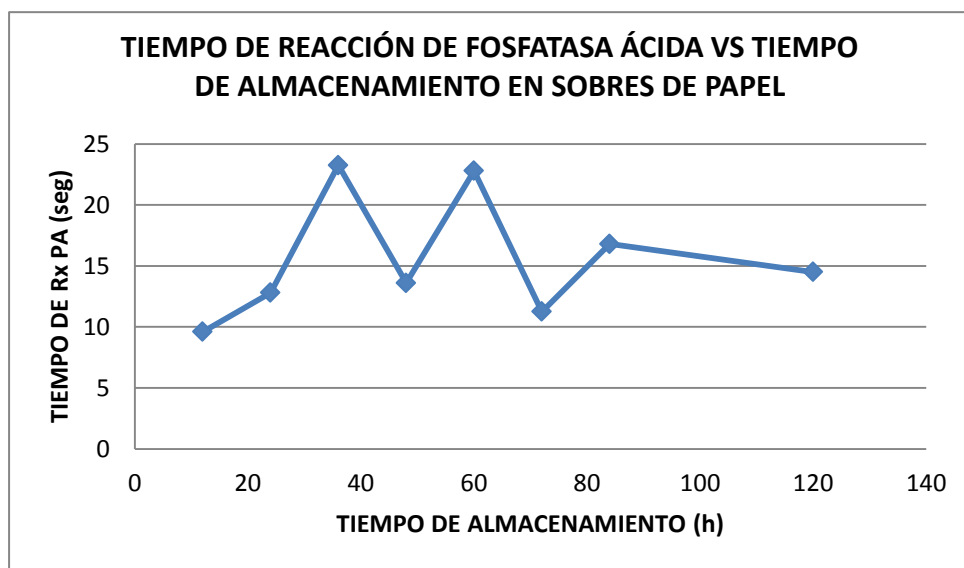
C= Cabezas de espermias visualizados

CC= Espermias con cabeza y cola visualizados

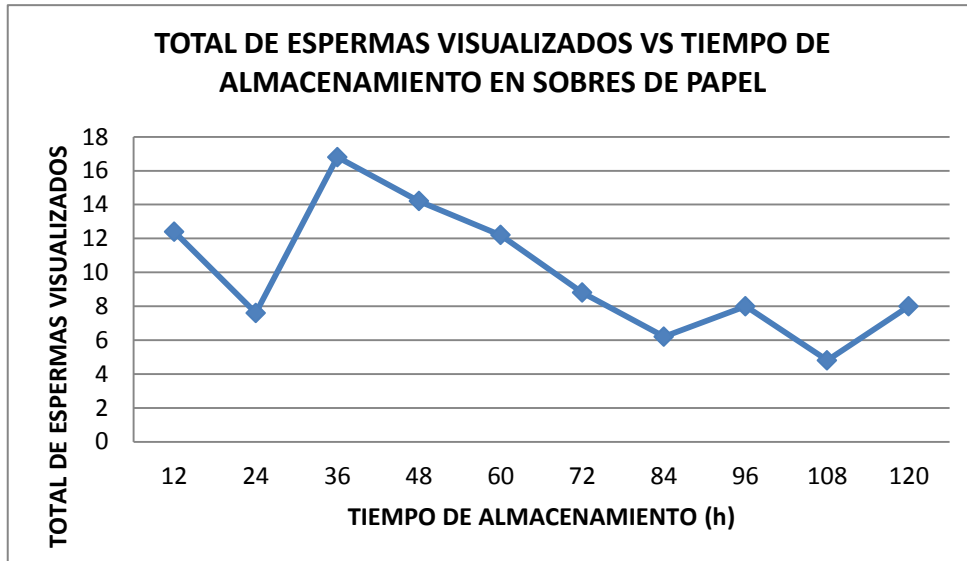
Tabla No.11 Estadístico de resultados de sobres de papel

GRUPO	t (h)	t de Rx (seg)	SPZ	C	CC	%C	%CC
A	12	9.6	12.4	11.6	0.8	93.5483871	6.4516129
B	24	12.8	7.6	7.6	0	100	0
C	36	23.25	16.8	14.8	2	88.0952381	11.9047619
D	48	13.6	14.2	14	0.2	98.5915493	1.4084507
E	60	22.8	12.2	11.4	0.8	93.442623	6.55737705
F	72	11.25	8.8	8.8	0	100	0
G	84	16.8	6.2	6.2	0	100	0
H	96	0	8	8	0	100	0
I	108	0	4.8	4.6	0.2	95.83333333	4.16666667
J	120	14.5	8	7	1	87.5	12.5

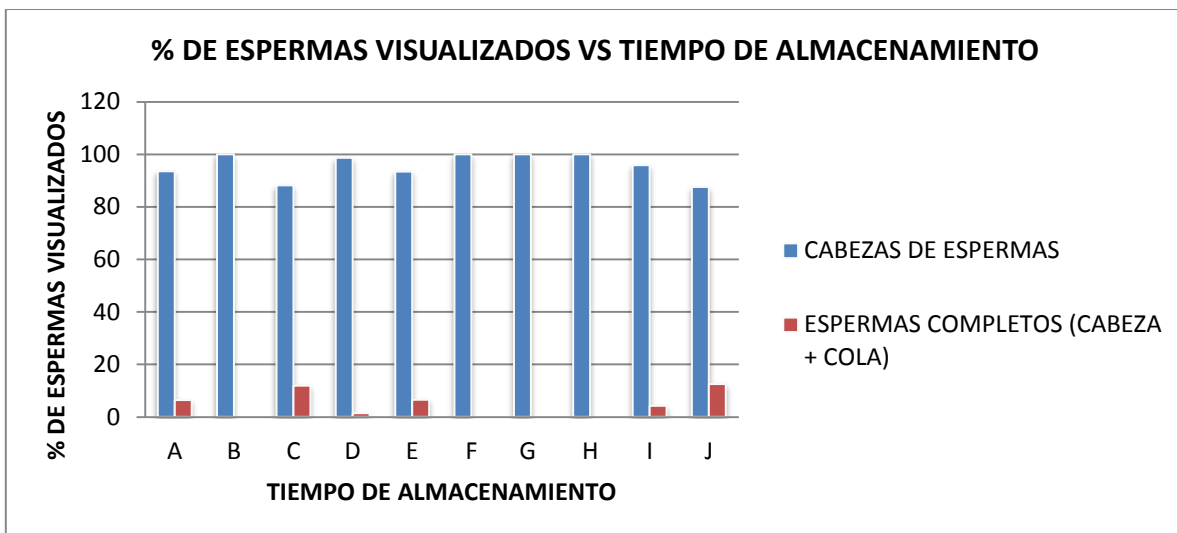
t (h)=tiempo de almacenaje en horas; t de Rx (seg)=tiempo de reacción de PA en segundos; SPZ=espermatozoides totales visualizados; C=cabezas visualizadas; CC=espermatozoides enteros visualizados; %C y %CC= porcentaje de cabezas y espermatozoides completos visualizados respectivamente. Los grupos H e I, se muestran en color rojo debido a que no son estadísticamente significativos, por su gran cantidad de resultados negativos, por lo que no fueron considerados para su graficación.



Gráfica No.1 Determinación de la enzima fosfatasa ácida vs tiempo de almacenamiento en sobres de papel.



Grafica No.2 Total de células espermáticas visualizadas vs tiempo de almacenamiento en sobres de papel.



Gráfica No.3 Porcentaje de células espermáticas completas vs cabezas de espermias almacenadas en sobres de papel.

Tabla No.12 Resultado de bolsas de plástico

No. de muestra		1				2				3				4				5			
Grupo	Tiempo (h)	Espermatozoides observados																			
		Preparación de las muestras y embalajes																			
		T	T	C	CC	t	T	C	CC	t	T	C	CC	t	T	C	CC	t	T	C	CC
A	12	6	17	16	1	5	7	7	0	4	16	15	1	7	7	7	0	6	10	8	2
B	24	5	30	28	2	7	10	10	0	6	38	32	6	7	28	25	3	9	19	18	1
C	36	7	23	13	10	9	11	9	2	7	16	13	3	6	30	17	13	7	21	15	6
D	48	7	29	13	16	7	21	10	11	7	24	9	15	7	28	13	15	7	17	9	8
E	60	15	29	13	16	10	24	9	15	6	28	10	18	7	23	8	15	9	24	12	12
F	72	7	17	10	7	9	18	6	12	6	19	14	5	4	20	9	11	7	22	15	7
G	84	40	18	6	12	20	14	6	8	13	13	5	8	12	15	6	9	12	19	14	5
H	96	33	15	11	4	15	10	6	4	14	16	9	7	16	9	4	5	19	15	6	9
I	108	20	4	4	0	11	3	3	0	10	2	2	0	12	8	8	0	33	7	6	1
J	120	11	17	15	2	8	10	10	0	11	12	12	0	8	18	18	0	10	9	9	0

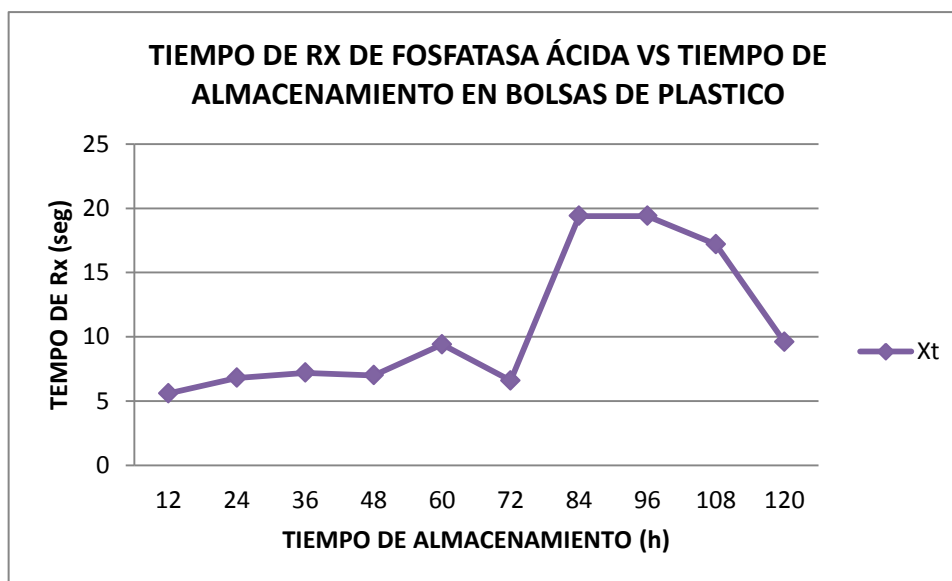
Se muestran las lecturas registradas tanto para el tiempo de reacción, como para las células espermáticas visualizadas en muestras positivas para líquido seminal colocado en hisopos y debidamente embaladas en bolsas de plástico durante un periodo de 5 días a temperatura ambiente.

- t= tiempo de reacción de la fosfatasa ácida en segundos
- T= total de espermias visualizados
- C= cabezas de espermias visualizados
- CC= espermias con cabeza y cola visualizados

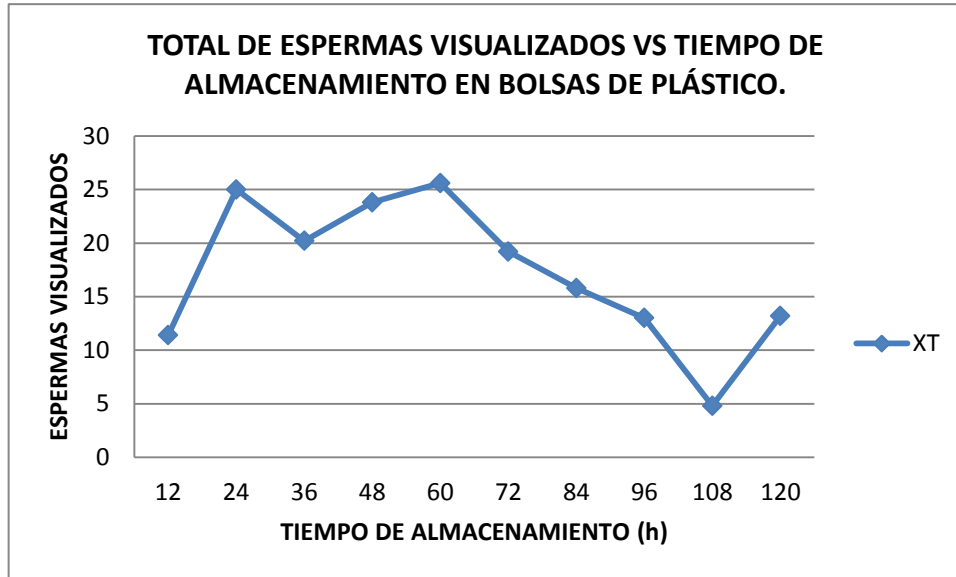
Tabla No.13 Estadístico de resultados de bolsas de plástico

GRUPO	t (h)	t de Rx (seg)	SPZ	C	CC	%C	%CC
A	12	5.6	11.4	10.6	0.8	92.9824561	7.01754386
B	24	6.8	25	22.6	2.4	90.4	9.6
C	36	7.2	20.2	13.4	6.8	66.3366337	33.6633663
D	48	7	23.8	10.8	13	45.3781513	54.6218487
E	60	9.4	25.6	10.4	15.2	40.625	59.375
F	72	6.6	19.2	10.8	8.4	56.25	43.75
G	84	19.4	15.8	7.4	8.4	46.835443	53.164557
H	96	19.4	13	7.2	5.8	55.3846154	44.6153846
I	108	17.2	4.8	4.6	0.2	95.8333333	4.16666667
J	120	9.6	13.2	12.8	0.4	96.969697	3.03030303

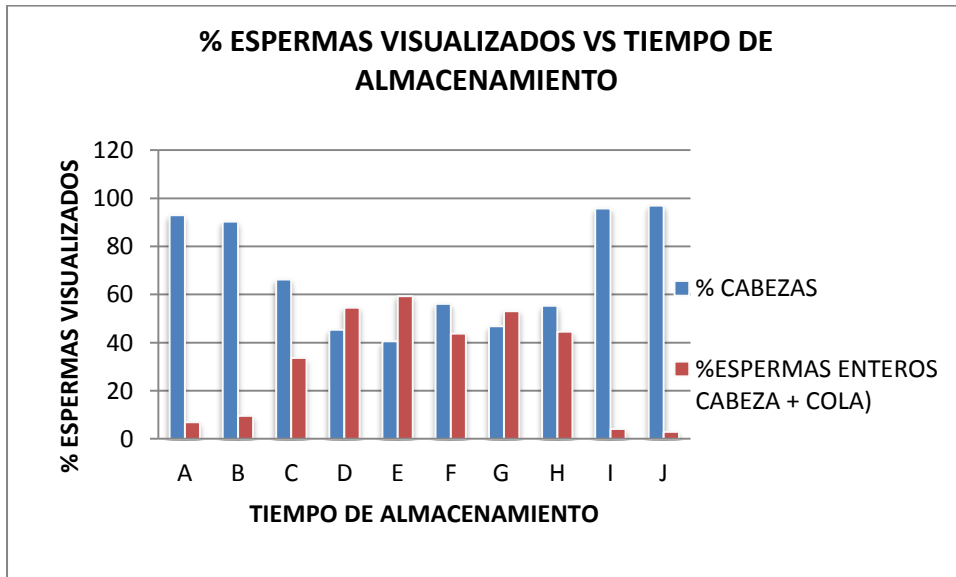
t (h)=tiempo de almacenaje en horas; t de Rx (seg)=tiempo de reacción de PA en segundos; SPZ=espermatozoides totales visualizados; C=cabezas visualizadas; CC=espermatozoides enteros visualizados; %C y %CC= porcentaje de cabezas y espermias completos visualizados respectivamente.



Gráfica No.4 Actividad de la enzima fosfatasa ácida vs tiempo de almacenamiento en bolsas de plástico.



Grafica No.5 Total de células espermáticas visualizadas vs tiempo de almacenamiento en bolsas de plástico.



Gráfica No.6 Porcentaje de células espermáticas completas vs cabezas de espermias observadas almacenadas en bolsas de plástico.

Tabla No.14 Resultados de tubos de vidrio.

No. de muestra		1				2				3				4				5			
Grupo	Tiempo (h)	Espermatozoides observados																			
		Preparación de las muestras y embalajes																			
		T	T	C	CC	t	T	C	CC	t	T	C	CC	t	T	C	CC	t	T	C	CC
A	12	8	25	22	3	6	26	22	4	7	13	11	2	5	21	18	3	7	19	16	3
B	24	10	10	10	0	7	20	16	4	6	15	12	3	5	27	20	7	4	17	15	2
C	36	10	31	15	16	5	28	7	21	7	21	9	12	7	28	4	24	6	33	3	30
D	48	10	48	20	28	6	45	10	35	7	34	9	25	7	35	15	20	7	34	16	18
E	60	30	55	27	28	9	51	25	26	7	42	17	25	7	14	5	9	10	32	15	17
F	72	9	35	10	25	4	44	24	20	8	40	18	22	11	29	11	18	9	25	15	10
G	84	25	27	8	19	Neg	38	16	22	15	22	6	16	10	25	10	15	20	19	4	15
H	96	Neg	10	10	0	40	7	7	0	20	11	9	2	16	5	5	0	Neg	5	4	1
I	108	18	9	9	0	Neg	5	5	0	20	12	10	2	15	14	9	5	10	10	10	0
J	120	11	35	10	25	17	29	10	19	4	29	9	20	Neg	32	4	28	Neg	27	7	20

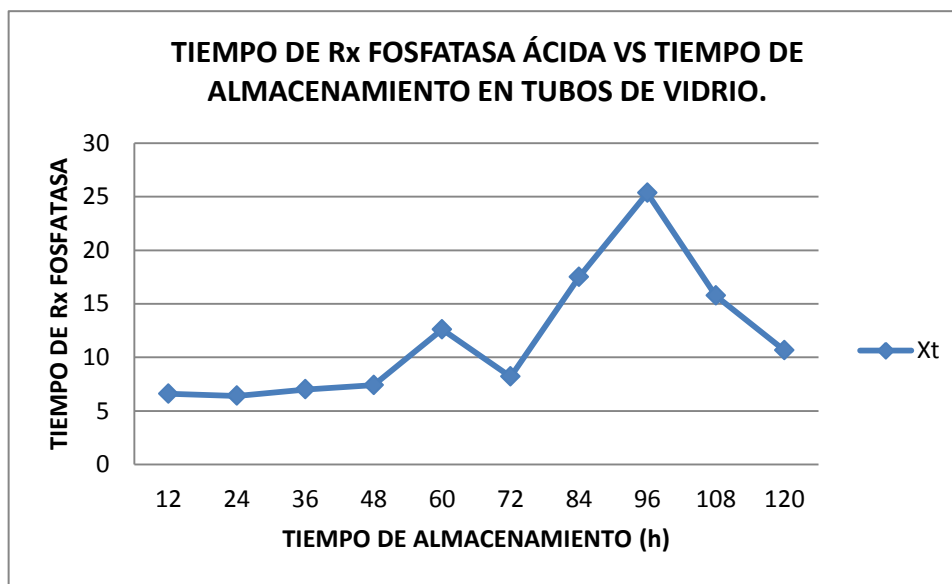
Se muestran las lecturas registradas tanto para el tiempo de reacción, como para las células espermáticas visualizadas en muestras positivas para líquido seminal colocado en hisopos y debidamente embaladas en tubos de vidrio durante un periodo de 5 días a temperatura ambiente.

- t= tiempo de reacción de la fosfatasa ácida en segundos
- T= total de espermias visualizados
- C= cabezas de espermias visualizados
- CC= espermias con cabeza y cola visualizados

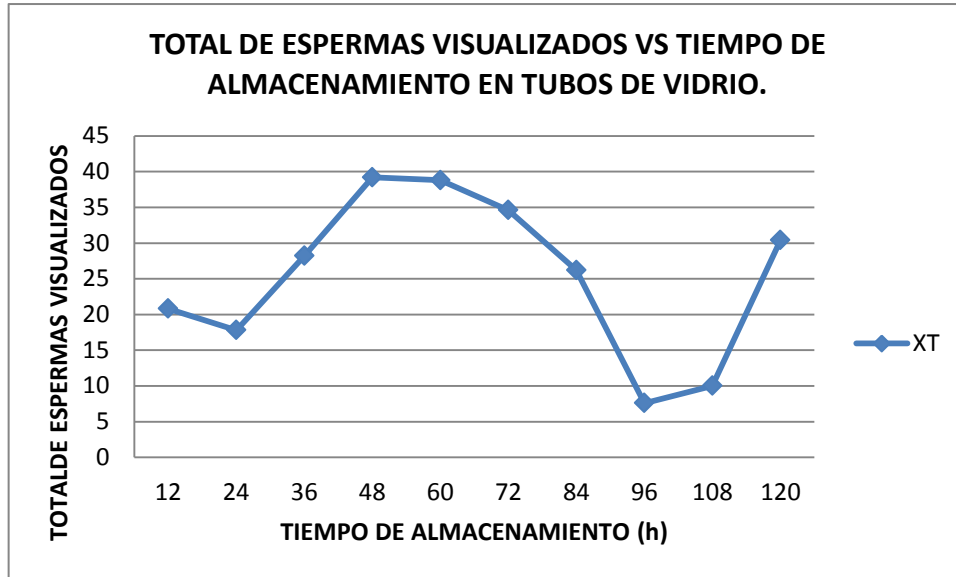
Tabla No.15 Estadístico de resultados de tubos de vidrio.

GRUPO	t (h)	t de Rx (seg)	SPZ	C	CC	%C	%CC
A	12	6.6	20.8	17.8	3	85.5769231	14.4230769
B	24	6.4	17.8	14.6	3.2	82.0224719	17.9775281
C	36	7	28.2	7.6	20.6	26.9503546	73.0496454
D	48	7.4	39.2	14	25.2	35.7142857	64.2857143
E	60	12.6	38.8	17.8	21	45.8762887	54.1237113
F	72	8.2	34.6	15.6	19	45.0867052	54.9132948
G	84	17.5	26.2	8.8	17.4	33.5877863	66.4122137
H	96	25.33333333	7.6	7	0.6	92.1052632	7.89473684
I	108	15.75	10	8.6	1.4	86	14
J	120	10.66666667	30.4	8	22.4	26.3157895	73.6842105

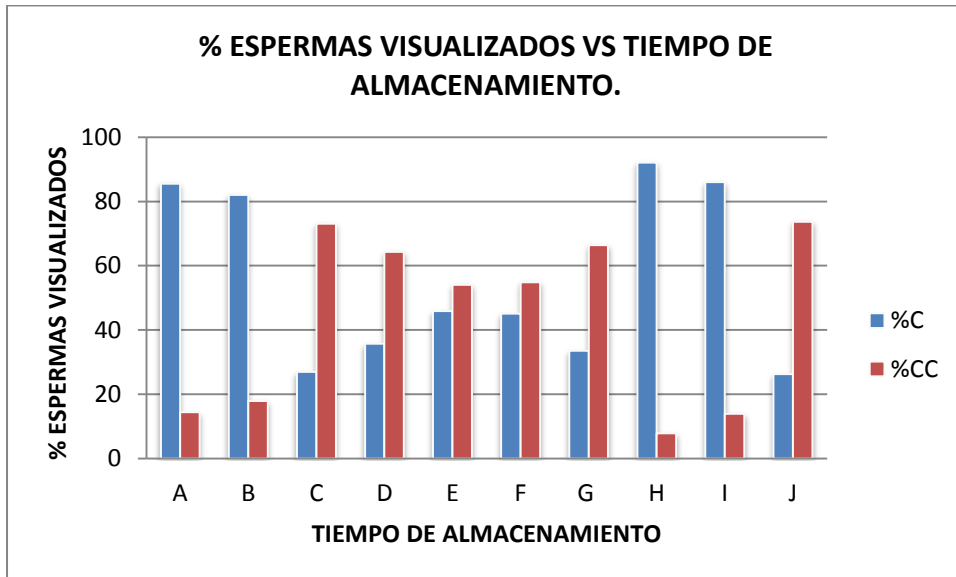
t (h)=tiempo de almacenaje en horas; t de Rx (seg)=tiempo de reacción de PA en segundos; SPZ=espermatozoides totales visualizados; C=cabezas visualizadas; CC=espermatozoides enteros visualizados; %C y %CC= porcentaje de cabezas y espermias completos visualizados respectivamente.



Gráfica No.7 Actividad de la enzima fosfatasa ácida vs tiempo de almacenamiento en tubos de vidrio.



Grafica No.8 Total de células espermáticas visualizadas vs tiempo de almacenamiento en tubos de vidrio.



Gráfica No.9 Porcentaje de células espermáticas completas vs cabezas de espermias almacenados en tubos de vidrio.

2.- Factores químicos que intervienen en la determinación de la enzima fosfatasa ácida.

Tabla No.16 Evaluación de detergentes.

Marcas de detergente	Marca A	Marca B	Marca C
Concentración	Tiempo de reacción		
1:100	Neg	Neg	Neg
1:250	Neg	Neg	Neg
1:500	Neg	Neg	Neg
1:1000	Neg	Neg	Neg

3. Factores microbiológicos que intervienen en la determinación de la enzima fosfatasa ácida.

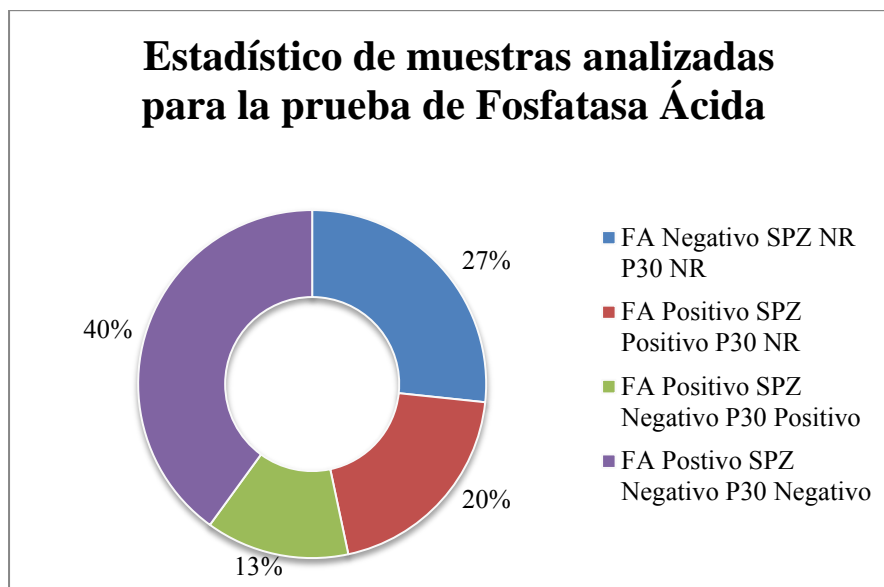
En un periodo de 3 meses se analizaron 45 muestras elegidas al azar, de presuntas víctimas de delitos sexuales, estas se seleccionaron delimitando solo a las muestras de exudado vaginal, remitidas al Laboratorio de Química Forense. Determinando así la presencia de la enzima Fosfatasa Ácida Prostática, Búsqueda de Espermatozoide y Antígeno Prostático Específico,

A continuación se presenta la siguiente tabla y grafico de los resultados obtenidos:

Tabla No.17 Resultados de las 45 muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida

Fosfatasa ácida	Espermatozoides	Antígeno Prostático Especifico	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Negativo	NR	NR	12	27%
Positivo	Positivo	NR	9	20%
Positivo	Negativo	Positivo	6	13%
Positivo	Negativo	Negativo	18	40%
Total			45	100%

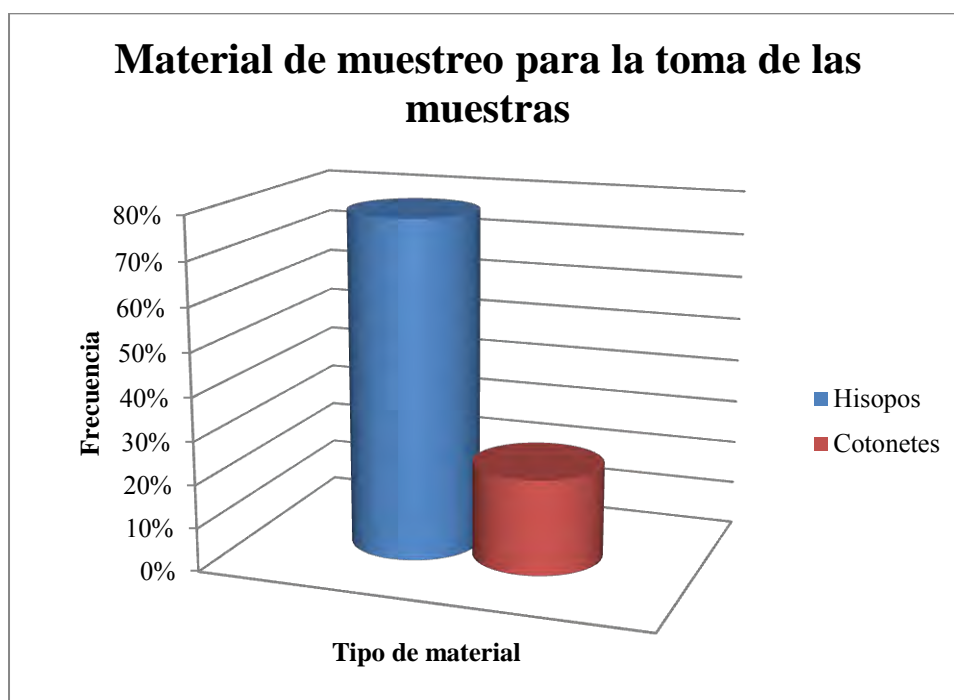
NR= No reportado



Grafica No.10 Resultados de las muestras analizadas para la prueba de Fosfatasa Ácida

Tabla No.18 Frecuencia del material usado para la toma de muestra.

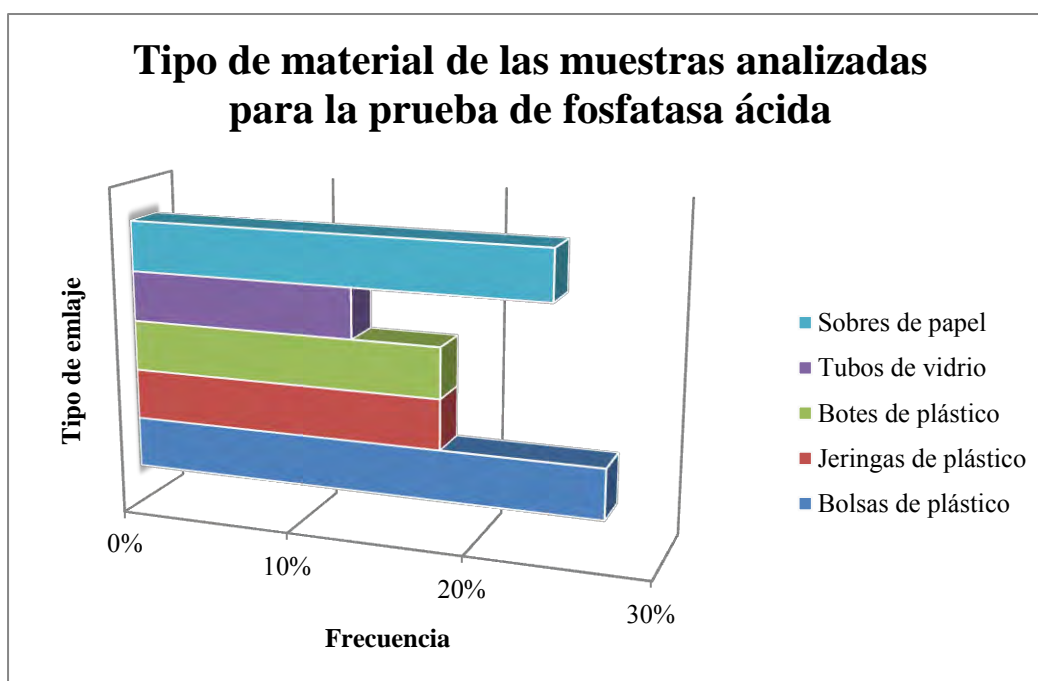
Material de muestreo	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
Hisopos	35	78%
Cotonetes	10	22%
Total	45	100%



Gráfica No.11 Frecuencia del material para toma de muestra.

Tabla No.19. Material de embalaje de las muestras analizadas.

Material de embalaje	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Bolsas de plástico	12	27%
Sobres de papel	11	24%
Jeringas de plástico	8	18%
Frascos de plástico	8	18%
Tubos de vidrio	6	13%
Total	45	100%

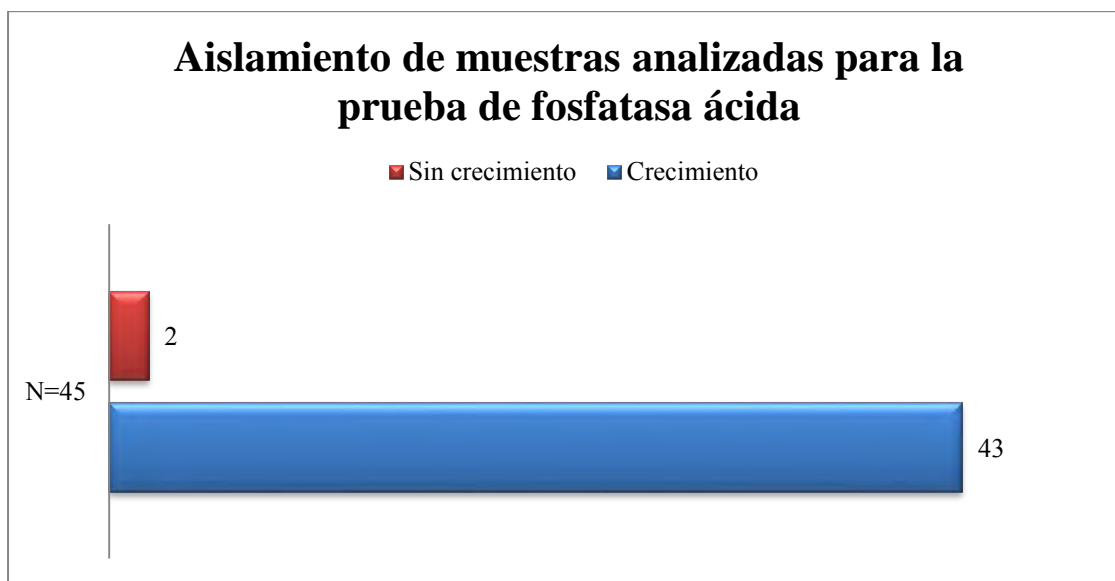


Gráfica No.12 Estadístico del tipo de material de las muestras.

Después de realizar pruebas para investigación de presencia de Semen y obtener los resultados de las 45 muestras tomadas al azar. Se realizó un estudio bacteriológico de las muestras, para determinar la biota presente en los hisopos y cotonetes, inoculando en diferentes medios de cultivo como: caldo nutritivo, Agar Sangre Carnero al 5%, Agar Chocolate y Biggy en condiciones de esterilidad, subcultivando a su vez en los diferentes medios de cultivo convencionales como: Sal y Manitol, Eosina Azul de Metileno (EMB), Chocolate, Sangre, Biggy, incubando a 37°C en condiciones aerobias y se realizaron observaciones a las 24 y 48 horas. Como se muestra en la siguiente tabla de información.

Tabla No. 20 Aislamiento de Bacterias a partir de las muestras analizadas para la prueba de fosfatasa ácida.

Aislamiento	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Crecimiento	43	96%
Sin crecimiento	2	4%
Total	45	100%



Gráfica No.13 Aislamiento de bacterias a partir de las muestras analizadas.

Tabla No.21 Datos de las muestras con resultado Fosfatasa Positivas sin crecimiento bacteriano

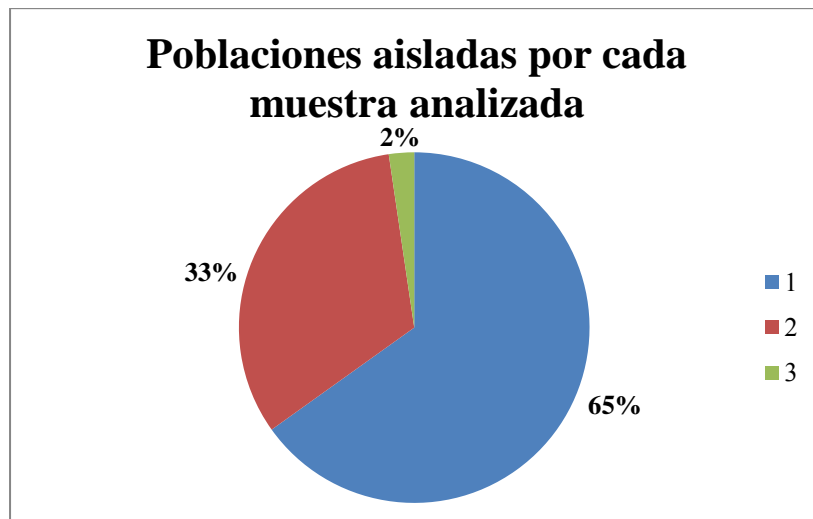
Fosfatasa ácida	Espermatozoides	Antígeno Prostático Especifico	Tipo de Embalaje	Número de Bacterias	Material	Bacterias
6seg	positivo	NR	BP	0	Hisopo	SC
5seg	positivo	NR	SP	0	Hisopo	SC

BP, Bote de Plástico; SP, Sobres de Papel; NR= No reportado, SC, Sin Crecimiento

Después de que las 43 muestras analizadas, presentaron un crecimiento bacteriano, se observó que en algunas se aislaron más de una población diferente por muestra siendo que la mayoría de las muestras presento característicamente una sola población.

Tabla No.22 Relación de poblaciones aisladas por cada muestra analizada.

Número de muestras <i>(a)</i>	Poblaciones aisladas <i>(b)</i>	$f=$ <i>[(a) (b)]</i>	Subtotal de poblaciones <i>F</i>
28	1	[(28) (1)]	28
14	2	[(14) (2)]	28
1	3	[(1) (3)]	3
43	Total		59



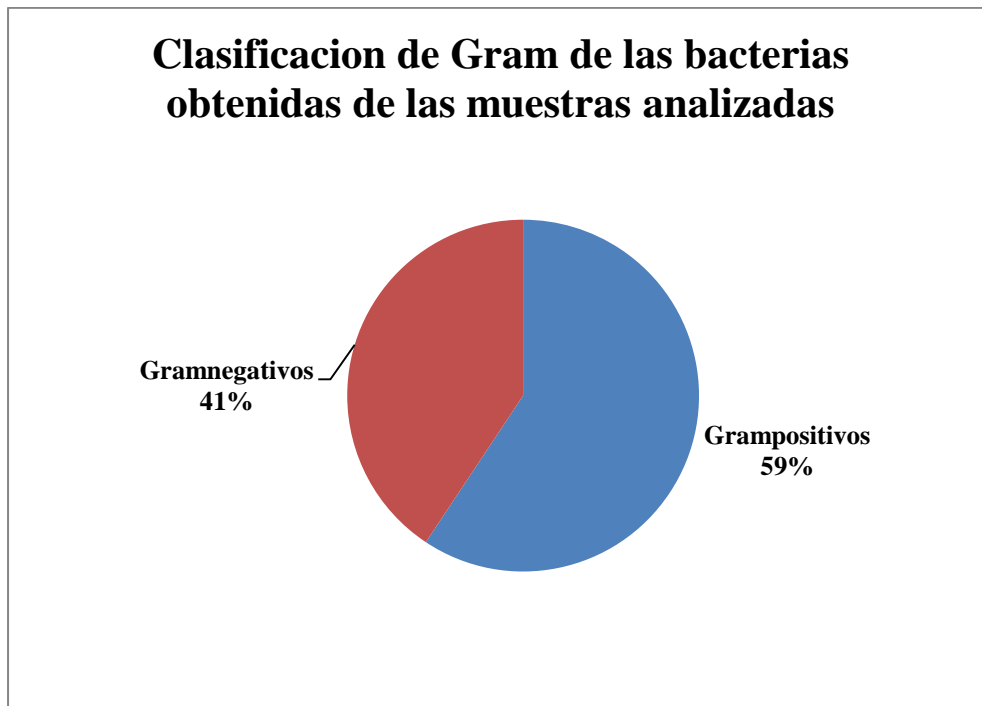
Gráfica No.14 Poblaciones aisladas por muestra analizada.

Como se muestra en la tabla No. 22, de las 43 muestras analizadas se obtuvieron 59 bacterias aisladas e identificadas por su morfología colonial, por lo cual se procedió a realizar la clasificación tintorial de Gram y describir su morfología microscópica.

Tabla No.23 Tinción de Gram de bacterias a partir de las muestras analizadas.

Tipo de Gram	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Grampositivos	35	59%
Gramnegativos	24	41%
Total	59	100%

Gráfica No.15 Estadístico de clasificación de Gram de bacterias obtenidas.

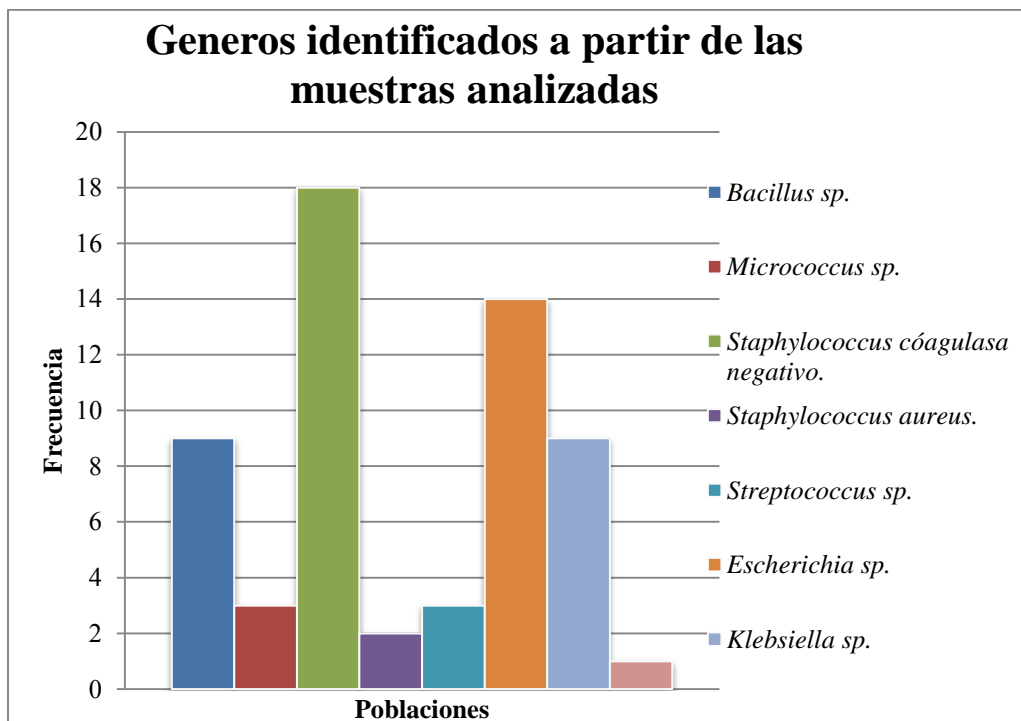


Gráfica No.15. Grafica de clasificación de Gram de bacterias obtenidas.

Después clasificar por la coloración de Gram, se procedió a realizar las Pruebas Especiales, y Bioquímicas en el laboratorio clínico para la Identificación de bacterias que se habían obtenido de las muestras. Pudiéndose identificar los géneros que se describen en la siguiente tabla:

Tabla No.24 Géneros identificados a partir de las muestras analizadas.

Tipo de Gram	Género	Frecuencia
Grampositivos	<i>Bacillus sp.</i>	9
	<i>Micrococcus sp.</i>	3
	<i>Staphylococcus cóagulasa negativo.</i>	18
	<i>Staphylococcus aureus.</i>	2
	<i>Streptococcus sp.</i>	3
Gramnegativos	<i>Escherichia sp.</i>	14
	<i>Klebsiella sp.</i>	9
	<i>Enterobacter sp.</i>	1
Total bacterias aisladas		59



Gráfica No.16 Gráfica de Géneros identificados a partir de las muestras analizadas

Tabla No.25 Prueba cualitativa para la determinación de actividad enzimática de la fosfatasa ácida vs carga bacteriana.

Cepa	Tiempo de reacción		
	Inoculo Ligero	Inoculo Mediano	Inoculo Denso
<i>Bacillus sp</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Micrococcus sp</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus</i> cóagulasa negativo.	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Streptococcus sp.</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Escherichia sp</i>	>60seg	>60seg	>60seg
<i>Klebsiella sp</i>	>60seg	>60seg	>60seg
<i>Enterobacter sp</i>	>60seg	>60seg	>60seg

Negativo. Sin Desarrollo de coloración; **>60seg:** Coloración después de los 60 segundos; **Inoculo Ligero:** Tocar ligeramente con la parte del algodón del hisopo y suave presión la colonia bacteriana; **Inoculo Mediano:** Tocar la colonia bacteriana con la parte del algodón del hisopo y girar 360° el hisopo para impregnarlo; **Inoculo Denso:** Impregnar todo el algodón del hisopo con la colonia bacteriana.

Tabla No.26 Datos de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas

Fosfatasa ácida	Espermatozoides	Antígeno Prostático Especifico	Tipo de Embalaje	Géneros de Bacterias Aislados	Material	Bacterias
14seg	Negativo	Negativo	SP	1	Hisopo	ESC
31seg	Negativo	Negativo	SP	2	Hisopo	ESC KS
32seg	Negativo	Negativo	BPL	2	Hisopo	ESC ES
36seg	Negativo	Negativo	JP	2	Hisopo	ESC ES
38seg	Negativo	Negativo	JP	1	Cotonete	ESC
34seg	Negativo	Negativo	JP	2	Hisopo	StA KS
32seg	Negativo	Negativo	BP	2	Cotonete	BS ECN
40seg	Negativo	Negativo	TV	1	Cotonete	ES
22seg	Negativo	Negativo	BP	2	Hisopo	ES KS
41seg	Negativo	Negativo	JP	1	Hisopo	ECN
35seg	Negativo	Negativo	BP	2	Hisopo	ECN KS
30seg	Negativo	Negativo	BP	2	Hisopo	ECN ES
39seg	Negativo	Negativo	SP	2	Hisopo	MiS ES
48seg	Negativo	Negativo	JP	1	Cotonete	ECN

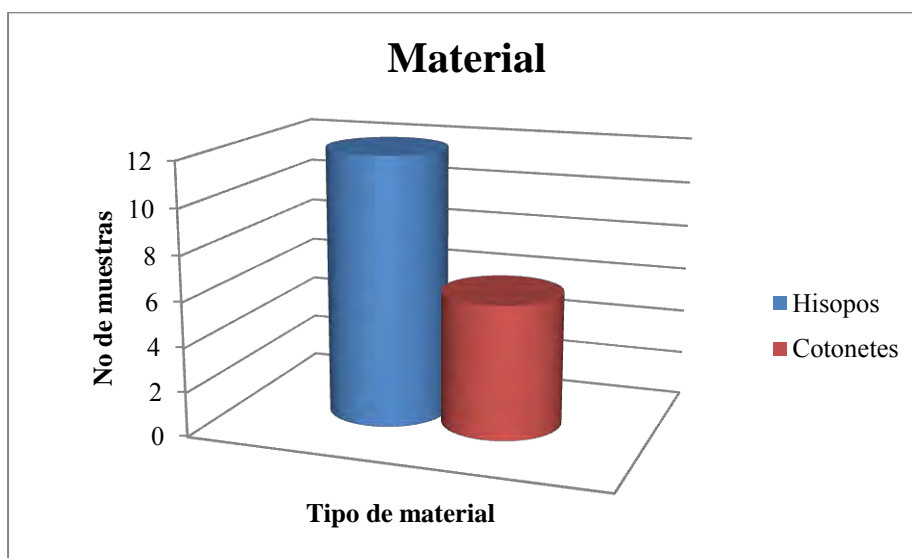
Continuación de Tabla No.26 Datos de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas

34seg	Negativo	Negativo	BP	2	Hisopo	ECN	KS
29seg	Negativo	Negativo	JP	1	Hisopo	ECN	
40seg	Negativo	Negativo	TV	2	Cotonete	BS	EnS
25seg	Negativo	Negativo	BP	1	Cotonete	ES	

SP, Sobres de Papel; TV, Tubo de vidrio; JP, Jeringas de Plástico; BP, Bote de Plástico; BPL, Bolsas de Plástico
ECN, Estafilococo cóagulasa negativo; ES, *Escherichia sp*; KS, *Klebsiella sp*; BS, *Bacillus sp*; EnS, *Enterobacter sp*, StA
Staphylococcus aureus; MiS, *Micrococcus sp*

Tabla No.27 Material de recolección de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas

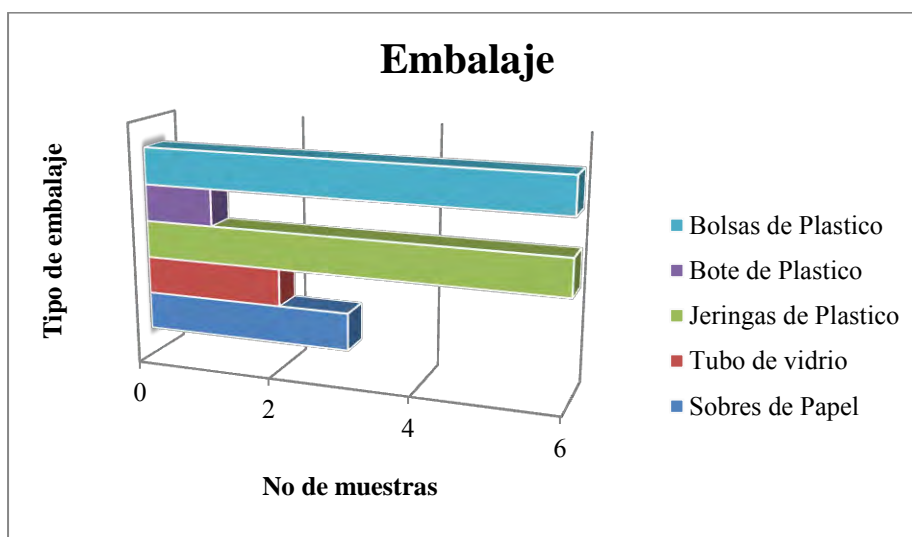
Material	Frecuencia Relativa
Hisopos	12
Cotonetes	6



Gráfica No.17 Frecuencia del material de muestreo de pruebas fosfatasa falso positivas

Tabla No.28 Tipo de embalaje de las muestras con resultado Fosfatasa Falso Positivas

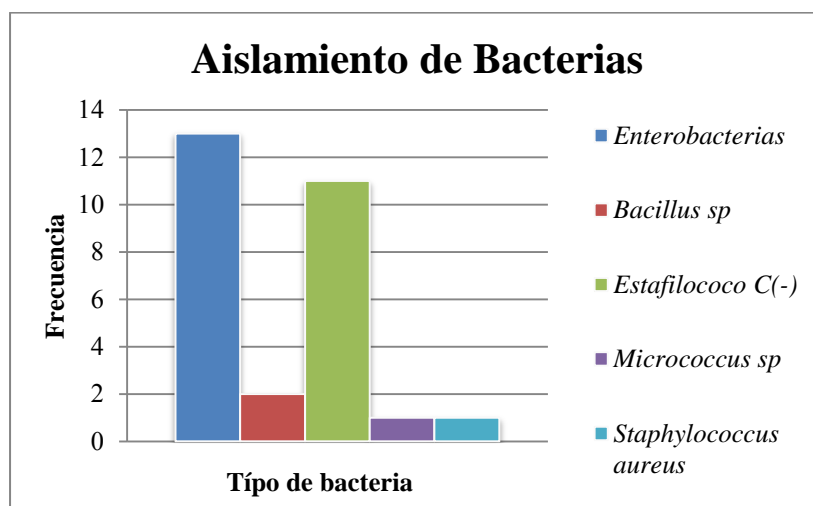
Embalaje	No 18
Sobres de Papel	3
Tubo de vidrio	2
Jeringas de Plástico	6
Bote de Plástico	1
Bolsas de Plástico	6



Gráfica No.18 Frecuencia del embalaje de pruebas fosfatasa falso positivas

Tabla No.29 Datos de las bacterias aisladas con resultado Fosfatasa Falso Positivas

Bacterias	No 28
<i>Enterobacteriaceae</i>	13
<i>Bacillus sp</i>	2
Estafilococo cóagulasa negativo	11
<i>Micrococcus sp</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1



Gráfica No.19 Aislamiento de bacterias de pruebas fosfatasa falso positivas

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1.- Evaluación de los factores físicos que intervienen en la determinación de fosfatasa ácida:

- **Material para toma de muestra:**

En lo respectivo al material de recolección que se analizó, el cuál consistió en hisopos y cotonetes, se pudo observar que estos no interactuaron con el reactivo de fosfatasa ácida, esto es que los reactivos: alfa naftilfosfato, orto dianizidina tetrazotizada y buffer de acetato, no presentaron reacción de desarrollo de color característico para la determinación enzimática de la fosfatasa ácida. Cabe hacer mención que en los hisopos los cuales estaban esterilizados o sin esterilizar respectivamente, ninguno interactuó con el reactivo de la fosfatasa ácida como se reporta en la tabla No.8

Con relación a los cotonetes, se manejaron diferentes marcas comerciales, las cuales debido al uso para el que están diseñados, no se requiere esterilización, por lo tanto se utilizaron sin esterilización, por lo anterior se puede observar que tampoco hay ninguna reacción, como se reporta en la tabla No.9

- **Tipo de embalaje:**

En lo respectivo al embalaje en sobre de papel, se aprecia en la grafica No.1 que el tiempo de reacción para la determinación enzimática de la fosfatasa ácida es directamente proporcional con respecto al tiempo, esto es observable de la hora 12 hasta la hora 60, debido a que la muestra todavía presentaba un porcentaje de humedad que nos permitiese hidratarse de forma adecuada.

De acuerdo al tiempo a partir de la hora 72 hasta las 120 horas las muestras se encontraban demasiado deshidratadas, lo cual se reflejo en un aumento excesivo del tiempo de reacción (>60 seg), marcadamente en los grupos identificados con la letra H e I como lo muestra la tabla No.11, tiempo en el cuál en condiciones de trabajo se consideraría como una reacción negativa, por tal motivo se optó por no incluirlos dentro de la valoración de datos.

Por lo anteriormente expuesto se tuvieron observaciones de células espermáticas en muestras en las cuales el tiempo de reacción excedía el minuto, esto debido a que éstas se encontraban demasiado deshidratadas

Para el caso del embalaje en bolsas de plástico, el factor de hidratación no se encontraba como una modificación al tiempo de reacción, esto es que las muestras al ser embaladas ya presentaban una humedad parcial.

En este embalaje se pudo apreciar en la grafica No.4 que el tiempo de reacción fue directamente proporcional con respecto al tiempo de almacenamiento, esto para el periodo de 12 hasta 60 horas. Para el periodo de 72 a 120 horas los resultados fueron discrepantes, tal vez debido a que no se realizó una carga espermática homogénea reflejando en el primer caso un aumento en el tiempo de reacción de forma excesiva.

Del tiempo 84 al 120 curiosamente el tiempo de reacción se comportó inversamente proporcional, esto causado tal vez a una sobre carga de la muestra. Como se observa en la misma gráfica No.4 de el tiempo de reacción contra tiempo de almacenamiento, durante las primeras 72 horas, el tiempo de la reacción se fue alargando ligeramente, sin embargo al tiempo de 84 horas tuvo un incremento considerable en la reacción y después empezó a descender, esto puede deberse a que en la lectura del tiempo 84 horas, no se haya tenido una visualización adecuada o que la cantidad de muestra colocada no haya sido la adecuada.

En cuanto a la visualización de células espermáticas, en la grafica No.5 también es posible observar que hay un alto número al inicio del estudio y conforme avanzó el tiempo esta cantidad fue disminuyendo gradualmente tal y como teóricamente se estimaba, ya que las células sufren un proceso de degradación con el paso del tiempo.

Ya como ultimo para el embalaje en donde se empleo tubos de vidrio existió una similitud en comportamiento con respecto al embalaje con bolsas de plástico, se pude observar en la grafica No.7, se tiene un comportamiento teóricamente estimado para el periodo de tiempo comprendido de 12 a 96 horas en donde el comportamiento de la actividad enzimática se ve afectado por la degradación de la enzima, sin embargo el único dato discrepante es el respectivo al de 72 horas, esto como consecuencia de una posible carga excesiva tanto de enzimas como de espermias.

Cabe hacer mención que para el hisopo número 5 del grupo H de la tabla No.14, el tiempo de reacción para el tiempo de la fosfatasa ácida no entra en los criterios de inclusión para resultados positivos, esto debido a que la cantidad de fosfatasa ácida presente no se encontraba en la cantidad necesaria al momento de la reacción.

Como se observa en la misma tabla No.14 de resultados, los diferentes tiempos y número de muestras, no se tuvieron actividad enzimática, pero sí se visualizaron células espermáticas, lo que permite pensar que no hubo una buena interpretación de las muestras a ese tiempo dado que la presencia de los espermias nos confirman la presencia de semen en la muestra, aún así, se observa el mismo fenómeno en cuanto al tiempo de reacción y espermias visualizados que en las bolsas de plástico.

2.- Evaluación de los factores químicos que intervienen en la determinación de fosfatasa ácida:

○ Evaluación de detergentes

Al evaluar los distintos detergentes a distintas concentraciones no se apreció ninguna interacción entre estos, con los reactivos alfa naftil fosfato de sodio y orto-dianizidina tetrazotizada, los cuales no presentaron ningún desarrollo de color característico para la determinación enzimática de la fosfatasa ácida como se reporta en la tabla No.16.

3.- Evaluación de los factores microbiológicos que intervienen en la determinación de fosfatasa ácida:

En el laboratorio se tiene un panel de pruebas para una valoración en la investigación de semen, para el esclarecimiento y material probatorio de los delitos sexuales. Los diferentes métodos empleados por el área química forense de forma rutinaria son las pruebas para determinar la presencia de la enzima fosfatasa ácida, búsqueda de espermatozoides y antígeno prostático específico.

La Prueba de Fosfatasa Ácida, es una técnica bioquímica de orientación o de screening, ya que recae más en su habilidad para descartar la presencia de semen en una mancha cuestionada, marcando así el camino a seguir que tienen las muestras para las pruebas confirmatorias de identificación de semen, como las son la observación de espermatozoides en preparaciones microscópicas realizadas a partir de las muestras a analizar y técnicas inmunológicas que revelan la presencia del antígeno específico de próstata (PSA ó proteína P30) dándole un proceso adecuado a dichas muestras.

De las 45 muestras de exudado vaginal elegidas al azar, de presuntas víctimas de delitos sexuales, se realizó un análisis estadístico descriptivo del material de recolección y embalaje en las cuales se encontraban las muestras analizadas. Como se reporta en la tabla No.18, el material para la toma de

muestra de exudados vaginales observados son 2 principalmente: Los hisopos y cotonetes teniendo mayor frecuencia con el 78% los hisopos, ya que este tipo de material permite mas practicidad a la hora de la recolección de la muestra por longitud del material y mayor superficie de contacto del algodón que con respecto a los cotonetes.

En la tabla No.19 se reporta el tipo de material de embalaje de las muestras de exudados vaginales encontrados fueron 5, bolsas, jeringas y botes de plástico sumando estos el 63% del total de este tipo de material mayormente utilizados, por otro lado los tubos de vidrio y los sobres de papel son los que tiene menor uso, esto es debido al acceso a estos tipos de materiales, ya que es más común tener material de plástico que de papel. Lo ideal sería que la mayoría de las muestras u objetos que las contengan estando en sequedad, deben embalsarse en contenedores de papel, ya que las muestras tardan en remitirlas al laboratorio para su análisis.

De las 45 muestras para el análisis microbiológico, se obtuvo que en 43 de ellos tuvieron crecimiento bacteriano y solo 2 muestras no se obtuvo un crecimiento como se observa en la grafica No.13, esto podría tener una explicación en la recolección de la muestra, esto es que solo se haya recogido el liquido lechoso sospechoso sin que hubiera una contaminación de la biota presente en la cavidad vaginal, ya que en la tabla No.21 de resultados para estas dos muestras se observan resultados de prueba de fosfatasa ácida positiva en tiempos muy cortos y la confirmación en la observación de espermas. Otra explicación, es que algunos microorganismos esperados son nutricionalmente exigentes, necesitando medios más específicos para su crecimiento y así como las condiciones de incubación.

En la tabla No.22 se reporta que de las 43 muestras analizadas que si presentaron crecimiento, solo 28 muestras presentaron solo una población bacteriana, 14 muestras presentaron dos poblaciones bacterianas diferentes y 1 muestra presento tres poblaciones bacterianas diferentes, sumando así un total de 59 poblaciones bacterianas aisladas. Teniendo una similitud entre la distribución de las bacterias grampositivos y gramnegativos como lo muestra la grafica No.15 de la clasificación de Gram. Dentro de las bacterias aisladas, 35 poblaciones son grampositivos: en las cuales se identificaron los géneros: *Bacillus sp*, *Micrococcus sp*, Estafilococos cóagulasa negativa, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, y 24 poblaciones son gramnegativos identificando los géneros: *Escherichia sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, todos estos descritos en la tabla No.24.

Relacionando la biota del aparato genital descrita bibliográficamente (tabla No.4) y las bacterias obtenidas de las muestras, Koneman 2009 y Forbes, Betty, 2004 describen los siguientes géneros: Estafilococos cóagulasa negativa, *Streptococcus sp*, *Escherichia sp*, *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp* (estos tres últimos Enterobacterias) como biota comensal del área vaginal, el género *Micrococcus sp.*, es parte de la biota del área genital externa y piel del perineo, algunos autores como Gamino-Arrollo, et. al., 2005 consideran *Staphylococcus aureus* como biota oportunista del área vaginal. Koneman 2009 describe al genero *Bacillus sp*, y Estafilococos cóagulasa negativa como biota comensal del aparato urinario.

Al conocer teóricamente la biota normal del aparato genital femenino se esperaría que obtuviera gran parte de esta a partir de las muestras analizadas, sin embargo el crecimiento se ve afectado por factores como, necesidades nutritivas, complejidad en su crecimiento, condiciones específicas de recolección e incubación para su crecimiento, como es el caso de:

- Los Lactobacilos, la mayoría de estas especies son aerobias facultativas, aun que crecen mejor en condiciones anaerobias o microaerófilas, sobre todo en el aislamiento primario, muchas cepas crecen muy mal, y si lo hacen es a pH 7.0, aunque el material humano se siembra en agar sangre.
- Los micoplasmas, para una obtención de estas bacterias se debe realizar con hisopos de material diferente al algodón ya que este resulta toxico, la otra es no permitir el secado de la muestra e inocular lo antes posibles después de la recolección de la muestra debido a sus requerimientos nutricionales.

Todos estos factores fueron superados en crecimiento por las Enterobacterias, Estafilococos y *Bacillus* mayormente aislados.

Es importante señalar que el médico legista es la persona especializada para la recolección de muestras, en victimas de agresión sexual, teniendo como objetivo recolectar muestras de los sitios anatómicos donde se cree hubo un contacto sexual.

Como se reportan en la tabla No.25 de la Prueba cualitativa del reto directo con las bacterias con el tiempo reacción del reactivo de la fosfatasa, encontramos que todas las bacterias grampositivos como gramnegativos no presentaron reacción para la actividad enzimática de la fosfatasa ácida, que marca los criterios

de inclusión para la prueba, teniendo que los grampositivos no desarrollaron ninguna coloración, sin embargo los gramnegativos presentaron la coloración después del criterio de inclusión (>60seg), determinando que la enzima que producen y que reacciona con el reactivo no es suficiente para obtener resultados falso-positivos. De tal modo que no presentó una reacción positiva se llegó hasta esta parte metodología.

La diferencia radicaría fundamentalmente en el tipo de célula, la procariota, como las bacterias y la eucariota, células del epitelio glandular. En las células procarióticas, todos los procesos ocurren en un único compartimiento limitado por la membrana celular. Por el contrario, en las células eucarióticas existe una separación espacial de las funciones: en el citoplasma se encuentran distintos organelos con una función específica, entre ellas los "lisosomas", un tipo de vesícula relativamente grande, formada en el complejo de Golgi, contienen enzimas hidrolíticas a las que aíslan de la célula y están implicados en las actividades digestivas intracelulares del epitelio glandular, la función de los lisosomas es contener a las enzimas hidrolíticas como la fosfatasa ácida en grandes cantidades, la célula eucariota cuenta con todos estos compartimientos u organelos que constituyen el sistema de endomembranas: vacuolas y vesículas, retículo endoplasmático, complejo de Golgi y lisosomas que cooperan en la síntesis, procesamiento químico, empaquetamiento y distribución de macromoléculas y que las células procariotas no poseen.

En la tabla No. 26 se reportan las muestras clasificadas dentro de las pruebas de fosfatasa falsos positivos, encontrando una distribución del doble en los hisopos que en los cotonetes de los materiales de la toma de muestra; el embalaje con mayor frecuencia son los de plástico, que los de papel, como lo muestra la grafica No.18.

Teniendo diferentes tipos de bacterias con mayor frecuencia de los grampositivos estos son los Estafilococos cóagulasa negativa y de los gramnegativos las Enterobacterias observándolos en la grafica No.19, aislando frecuentemente dos poblaciones diferentes por cada muestra. El material de embalaje y las bacterias con mayor frecuencia tiene una correlación, ya que en los embalajes de plástico se conservan la humedad, por consecuencia así contribuye a la proliferación de microorganismos, porque el agua es un requerimiento para el desarrollo y metabolismo de estos.

Discusión de resultados.

Una vez evaluado el material para la toma de muestra, y dado que no se cuenta con ningún antecedente bibliográfico, más que el que ha dado la experiencia misma se eligió el hisopo como el mejor para la recolección de muestras, debido a las características que posee como el permitir abarcar una mayor área al momento de la toma de muestra en comparación con el cotonete, y además por ser el material mencionado en el Protocolo Nacional para la toma de muestras levantamiento de indicios, embalaje y envío para la base nacional de datos genéticos del Comité Nacional de genética Forense del año 2008¹⁷.

En lo referente al tipo de embalaje se pudo comprobar que, tal y como lo menciona el mismo protocolo del Comité Nacional de Genética Forense, en donde refiere que las muestras deben ser embaladas en papel individualmente para poder ser transportadas al laboratorio y que podrán ser embaladas en bolsas de plástico las muestras húmedas siempre y cuando sean remitidas inmediatamente al laboratorio para evitar su degradación¹⁷, tanto los tubos de vidrio al igual que las bolsas de plástico presentan la misma condición, es decir no permiten que la muestra pierda su humedad y consecuentemente se propicia el incremento en la contaminación bacteriana degradando la muestra, sin embargo también se observo que ayuda a eliminar la rehidratación, manteniendo la concentración de la muestra.

En lo referente a los factores microbiológicos, sabemos que las bacterias poseen un metabolismo y que secretan sustancias de desecho que degradan la muestra, ocasionando no obtener resultados del análisis o estos no son fiables, en el Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry¹⁶ menciona que Pinto en 1959 descubrió que las bacterias producen la enzima fosfatasa ácida, sin identificar los géneros bacterianos y si estos procedían de biota del aparato genital femenino, lo cual se realizo en este trabajo, como se observo no son factor determinante para obtener resultados falsos positivos en la prueba cualitativa del método alfa naftil fosfato para el criterio de inclusión, que se describe en Saperstein Richard, Forensic Science Handbook²¹ y el cual es utilizado por el Manual de Procedimientos del Laboratorio de Química Forense²⁵

Finalmente es importante recalcar que el presente trabajo ayuda a entender al perito químico, al momento de intervenir en muestras relacionadas a delitos sexuales, descartando los factores aquí evaluados al momento de realizar su análisis y por lo tanto emitir un dictamen mucho más confiable.

CONCLUSIONES

Una vez evaluados los factores físicos, en los que se evaluó el material para la toma de muestra y los embalajes, se encontró que el material de toma de muestra no interfiere con la determinación de la enzima fosfatasa ácida.

En los embalajes se observó que afectan principalmente la hidratación de la muestra pudiendo retrasar el tiempo de reacción, sugiriendo que la elección del mismo estará dado en función del tiempo que transcurrirá entre la toma de muestra y el procesamiento de la misma, dado que entre más tiempo, calor, humedad, y las condiciones de almacenamiento sean más prolongadas, más corta es la vida media de la enzima.

Para muestras que se almacenarán en un tiempo largo, la mejor opción es el sobre de papel, embalando la muestra en total sequedad y rehidratar haciendo hincapié al momento del analizar la muestra.

Para muestras que se almacenarán poco tiempo o que serán leídas casi inmediatamente después de ser recolectadas, las opciones son las bolsas de plástico y los tubos de vidrio, estos conservarán la humectación de la muestra dando como resultado que se evalúen los fluidos originales, sin intervención de por ejemplo, la solución salina que propicia una dilución de la muestra, no recomendando colocar las muestras (hisopos) en cantidades abundantes de solución, lo ideal es una buena humectación de los mismos antes de tomar la muestra.

En cuanto a los factores químicos, en los que se evaluaron diferentes marcas de detergentes, se observó que no tienen ninguna interferencia por lo que no afectan en la determinación enzimática de la fosfatasa ácida.

Por último, en lo referente a los factores microbiológicos, se aislaron e identificaron las poblaciones de: *Estafilococos cóagulasa negativa*, *Streptococcus sp*, *Micrococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp*, *Escherichia sp*, *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp* como la carga microbiana presente en muestras de exudado vaginal de presuntas víctimas de delitos sexuales. Determinando así que los microorganismos aislados e identificados anteriormente no son factor concluyente para obtener resultados falsos-positivos no interfiriendo en la prueba de fosfatasa ácida. Esta prueba puede utilizarse no solamente como tal para la exclusión del semen, sino también como complemento confirmatorio de las que ya constituyen rutina en este tipo de análisis, para reforzar los datos obtenidos

PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Recomendaciones como medida de seguridad para realizar la determinación enzimática de la fosfatasa ácida:

- Utilizar los hisopos estériles o aplicadores con punta de algodón cuando la toma de muestra sea vía vaginal.
- La mayoría de las muestras u objetos que las contengan, deben embalsarse en contenedores de papel.
- Los indicios húmedos pueden recolectarse en contenedores de plástico y transportarse inmediatamente al laboratorio, el tiempo en el que estos indicios pueden estar en este tipo de contenedores debe ser menor a 2 hrs.
- Una vez colocados en un lugar seguro, los indicios deben secarse completamente, para colocarse en contenedores de papel.
- Bajo ninguna circunstancia, el indicio húmedo debe permanecer en contenedores de plástico sin secarse. La humedad promueve el crecimiento microbiano que puede destruir el indicio biológico.
- Si se recupera muestras en contenedores, deberá trasladarse de inmediato y a temperatura controlada
- Las muestras se embalaran en recipientes adecuados sin adicionar conservadores.
- Deberán ir etiquetadas y se remitirán refrigeradas para impedir su degradación por acción de los microorganismos presentes en las cavidades vaginal, anal y bucal.
- Es además muy importante recoger la ropa de la víctima y también, si la hay, del sospechoso, sobre la cual también se practicará una búsqueda de indicios.
- Evitar la contaminación potencial del indicio, ya que esta puede ocurrir en el lugar de los hechos, durante la recolección, en su almacenamiento en el embalaje, durante la transportación al laboratorio, y su análisis
- El propio sustrato puede contener contaminantes químicos como tintes y grasas, que evitan el posterior análisis del indicio.

Propuestas de estudios posteriores que ayudarán a la confiabilidad en la prueba de la fosfatasa ácida:

- Evaluar otros posibles factores de afecten a la prueba como por ejemplo otros fluidos corporales tales como orina o saliva, bebidas como café o cerveza, para comprobar que por sí solas no interfieren en la determinación

de la enzima fosfatasa ácida de origen prostático, e incluso combinaciones de ellas, ejemplo mucosa vaginal, biota bacteriana, y orina, sirva para descartar la posibilidad de que en conjunto puedan potenciar la actividad de dicha enzima llegando a generar un resultado del tipo falso positivo.

- Una vez evaluados otros factores de interferencia, realizar un estudio igual al que aquí se presentó, pero con un número de muestras mucho mayor con la finalidad de realizar una validación del método que nos permita sustentar que nuestros resultados, son confiables dado que se tendría un método preciso, reproducible y específico de la actividad enzimática.
- En este trabajo se evaluó si el propio detergente con el reactivo de fosfatasa daba un reacción positiva característica de desarrollo de color, sin embargo se propone evaluar si el detergente no inhibe o agota la actividad de la enzima fosfatasa ácida prostática y así afecte el resultado final de la prueba.
- Evaluar productos comerciales de uso común que contenga fenol y sus derivados de este, ya que este compuesto orgánico es producto final derivado de la catálisis de la enzima fosfatasa, siendo este el que se acopla con el reactivo revelador dando una coloración característica.

REFERENCIAS:

1. Aguilar Santelises L., Escalante Pliego R., Manual de Prácticas Bioquímica Celular y de los Tejidos II: México: UNAM FES Zaragoza, Carrera Q.F.B. 2002
2. C. Poirot, B. Cherruau, "Infertilidad Masculina Aspectos clínicos e investigaciones Biológicas", Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39(2): 225-41
3. Betty Forbes, Sahm Daniel, Diagnóstico microbiológico 11ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2004
4. Wadie F. Gohara, "Rate of Decrease of Glutamyltransferase and Acid Phosphatase Activities in the Human Vagina after Coitus", Clin.Chem.26/2, 254-257 (1980)
5. Corona Martinez D. G. "Técnicas para la identificación y confirmación de líquido seminal en manchas recolectadas en el lugar de los hechos" [tesis que para obtener el título de: Químico Farmacéutico Biólogo UNAM]. 2010. México D.F.
6. Rajasingam S. Jeyendran, Interpretation of semen analysis results A practical guide, USA: Cambridge University Press, 2000.
7. García Porrero Juan A. Juan M. Hurlé, Anatomía Humana, Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2005
8. Curtis Helena, N. Sue Barnes, Biología, [monografía en CD-ROM]. 6 ed., Editorial Médica Panamericana, 2008.
9. Koneman Elmer W., et. al. Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas en Color, 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008
10. Código Penal Federal, Código Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 14 de agosto de 1931, Texto vigente Última reforma publicada DOF 30-11-2010 Poder Ejecutivo Federal.- Estados Unidos Mexicanos.- México
11. Vargas Alvarado E, Medicina Forense y Deontología Medica, México: Trillas, 1991
12. Verdú P.F.A., Alvarez S.M., Castello P. A., Feutch M.M., Negre M.C., Rodriguez A.H., et. al. Del indicio a la evidencia. Técnicas de criminalista. Granada: Edit. Comares, 2005
13. Sánchez Rodríguez Martha A. Enzimología Clínica, Material elaborado para alumnos del 9º semestre de la carrera de QFB área Bioquímica Clínica, México: UNAM FES Zaragoza 2005
14. Ángel M. Gilberto, Ángel R. Mauricio, Interpretación Clínica del Laboratorio, 7ª ed., Colombia: Editorial Medica Internacional, 2006

15. Gamino-Arrollo Ana Estela, Barrios Ceballos Minerva Paola, Lydia Patricia Cárdenas de la Peña, Fernando Anaya-Velázquez y Felipe-Vaca, "Flora Normal, Probióticos y Salud Humana" Acta Universitaria, 2005; 15(3): 34-40
16. R.E. Giessen, Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, New York, a publication of the National Institute of Justice: 1983
17. Comité Nacional de Genética Forense. Protocolo nacional para la toma de muestras, levantamiento de indicios, embalaje y envío para la base nacional de datos genéticos. México 2008
18. Project Cotton, The University of Missouri. Department of Textile and Apparel Management University of Missouri [en línea]. Columbia. MO.2008 <http://cotton.missouri.edu/Classroom-Chemical%20Composition.html> [consultado: 23 mayo 2011]
19. Kirk-Othmer. Enciclopedia de Tecnología Química, México D.F., ed. Limusa Noriega editores, 1998.
20. Mac Faddin Jean F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, 3ª ed., Buenos Aires: Médica Panamericana, 2004.
21. Saperstein Richard, Forensic Science Handbook, Vole, 2da ed. USA, Prentice Hall 2002
22. Barrett Kim E. et. al., Ganong Fisiología Medica, 23 ed., México, Edit. McGraw-Hill Interamericana, 2010
23. Libro de Gobierno del Área de Química Forense, con sede en Texcoco en el periodo del 2009 al 2010
24. R. Sarmiento, H. J. Morris "Marcadores para el diagnostico genérico en la investigación criminalística del semen", Revista Cubana de Química, 2003, Vol. XV, N° 1: 55-62
25. Manual de Procedimientos. Laboratorio de Química Forense Texcoco. México: PGJEM
26. Pumarola Busquets Agustín, Microbiología y Parasitología Medica, 2a ed. Barcelona: Masson, 1987(Reimp 2000)
27. McMurry John, Química Orgánica, 5ª ed.: International Thomson Editores, México 2001.
28. Código Penal para El Estado de México, Publicado en la Gaceta del Gobierno, 20 de marzo del 2000, Ultima reforma publicada: 27 de diciembre de 2007. La H. "LIII" Legislatura del Estado de México.
29. Código De Procedimientos Penales para El Estado de México, Publicado en la Gaceta del Gobierno, 23 de abril del 2009, La H. "LVI" Legislatura del Estado de México.

30. Y. Torres, M. Aler, A. Plata, A. Domínguez, P. Sanz y M. Gisbert, "Factores que afectan al análisis biológico de las muestras de agresiones sexuales" Cuad. Med. Forense 2007; 13(47):45-56
31. Quispe Mayta Sergio E., Silvia Tarifa Espinoza, Rubén Solíz Pacheco, Armando Sierra Gareca, "Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense" Biofarbo, 2010; 18(2): 91 - 95