



**Universidad  
Norbert Wiener**

**UNIVERSIDAD PRIVADA  
NORBERT WIENER**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS**

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA  
PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E  
IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS  
FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL  
NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.**

**Para optar el grado académico de  
MAESTRO EN CIENCIA CRIMINALÍSTICA**

**Presentado por:  
LIC. CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ**

**Asesor:  
Dr. JULIO ALONSO FOX CORTEZ**

**Lima- Perú**

**2017**

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA  
PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E  
IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS  
FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL  
NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.**

**Línea de Investigación:**

**Técnicas, métodos y procedimientos de la actividad  
pericial criminalística**

## **DEDICATORIA**

A Dios y a mis padres Baldomero y Alicia; a mi esposa Lucy y mis hijos Diego y Diana por su inmenso amor.

***Lic. CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ***

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Asociación Peruana de Citotecnólogos por formar parte de la comisión académica y a su vez de fortalecer mi formación profesional como Citólogo.

Agradecer a la Institución donde laboro el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, por mi capacitación constante y labor profesional en el servicio de Anatomía Patológica en las áreas de Citología, Histología e Inmunohistoquímica.

Agradezco a mi esposa Lucy Atoche, a mis hijos Diego y Diana por su amor, comprensión, apoyo y confianza en mí superación profesional.

Al Doctor Ángel Ascarza Gallegos por su profesionalismo y dedicación en la formación de gestores en Criminalística.

***Lic. CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ***

## ÍNDICE

<i>DEDICATORIA</i> .....	<i>iii</i>
<i>AGRADECIMIENTO</i> .....	<i>iv</i>
<i>ÍNDICE</i> .....	<i>v</i>
<i>Lista de Tablas</i> .....	<i>viii</i>
<i>Lista de Gráfica</i> .....	<i>xi</i>
<i>Lista de Figuras</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Resumen</i> .....	<i>xv</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xvi</i>
<i>I. INTRODUCCIÓN</i> .....	<i>xvii</i>
<i>DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD</i> .....	<i>xix</i>
<i>CAPÍTULO I:</i> .....	<i>1</i>
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i> .....	<i>1</i>
1.1. <i>Descripción de la realidad problemática</i> .....	<i>1</i>
1.2. <i>Identificación y formulación del problema</i> .....	<i>3</i>
1.2.1. <i>Problema general</i> .....	<i>3</i>
1.2.2. <i>Problemas específicos</i> .....	<i>3</i>
1.3. <i>Objetivo de la investigación</i> .....	<i>4</i>
1.3.1. <i>Objetivo general</i> .....	<i>4</i>
1.3.2. <i>Objetivo Específicos</i> .....	<i>4</i>
1.4. <i>Justificación y viabilidad de la investigación</i> .....	<i>5</i>
1.5. <i>Delimitación de la Investigación</i> .....	<i>7</i>
1.6. <i>Limitaciones de la investigación</i> .....	<i>9</i>
<i>CAPÍTULO II</i> .....	<i>10</i>
<i>MARCO TEÓRICO</i> .....	<i>10</i>
2.1. <i>Antecedentes de la investigación</i> .....	<i>10</i>
2.1.1. <i>Antecedentes internacionales</i> .....	<i>10</i>
2.1.2. <i>Antecedentes nacionales</i> .....	<i>14</i>
2.2. <i>Bases Teóricas</i> .....	<i>16</i>
2.2.1. <i>Variable 1</i> .....	<i>16</i>
2.2.2. <i>Variable 2</i> .....	<i>112</i>
2.3. <i>Formulación de la Hipótesis</i> .....	<i>145</i>

2.3.1. <i>Hipótesis General</i> .....	145
2.3.2. <i>Hipótesis Específico</i> .....	145
2.4. <i>Operacionalización de variables e indicadores</i> .....	146
2.5 <i>Descripción de términos básicos</i> .....	152
<b>CAPÍTULO III:</b> .....	158
<b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	158
3.1 <i>Tipo de investigación</i> .....	158
3.2. <i>Diseño de la Investigación</i> .....	158
3.3 <i>Población y muestra</i> .....	159
3.4 <i>Técnicas e instrumentos</i> .....	161
3.4.1 <i>Descripción del Instrumento</i> .....	164
3.4.2 <i>Validación del instrumento</i> .....	165
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	167
<b>PRESENTACION Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	167
4.1. <i>Procesamiento de datos</i> .....	168
4.1.1. <i>Validación de contenido de las variables</i> .....	168
4.1.2. <i>Escala: confiabilidad del instrumento de medición</i> .....	170
4.1.3. <i>Análisis estadístico</i> .....	172
4.1.4. <i>RESULTADOS DE LA VARIABLE 1</i> .....	197
4.1.5. <i>RESULTADOS DE LA VARIABLE 2</i> .....	198
4.2. <i>Prueba de Hipótesis</i> .....	199
4.2.1. <i>Prueba de hipótesis general</i> .....	199
4.2.2. <i>Prueba de hipótesis específica 1</i> .....	200
4.2.3. <i>Prueba de hipótesis específica 2</i> .....	201
4.2.4. <i>Prueba de hipótesis específica 3</i> .....	202
4.2.5. <i>Prueba de hipótesis específica 4</i> .....	203
4.3. <i>Discusión de los resultados</i> .....	205
<b>CAPÍTULO V</b> .....	209
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	209
5.1. <b>CONCLUSIONES</b> .....	209
5.2. <b>RECOMENDACIONES</b> .....	212
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	214

<i>ANEXOS</i> .....	223
<i>Anexo 1: Carta de presentación</i> .....	223
<i>Anexo 2: Matriz de operacionalización de las variables</i> .....	226
<i>Anexo 3: Instrumento de recolección de datos</i> .....	232
<i>Anexo 4: Certificado de validez de contenido del instrumento</i> .....	242
<i>Anexo 5: cuestionario de instrumento</i> .....	249
<i>Anexo 6: Carta de autorización de cuestionario de instrumento</i> .....	254
<i>Anexo 7: Matriz de consistencia</i> .....	255
<i>Anexo 8: Fotos de estudio analítico</i> .....	259

## Lista de Tablas

Tabla 1	Interpretación de resultados de fosfatasa ácida versus P-30 para la identificación de semen	26
Tabla 2	Clasificación de la viscosidad y símbolo asociado	42
Tabla 3	Cada una de estas categorías recibe una nomenclatura distinta.	44
Tabla 4	Clasificación de la aglutinación en distintos grados y símbolo de cada uno.	45
Tabla 5	Valores de referencia de cada una de las distintas variables seminales.	49
Tabla 6	Interpretación de resultados de fosfatasa ácida para identificación de semen	55
Tabla 7	Normas de petición para la determinación de semen y su envío en laboratorios forenses de biología.	55
Tabla 8	Procesamiento de las diferentes presentaciones en la que podemos encontrar el semen como indicio biológico.	56
Tabla 9	Presencia de espermatozoides en cavidades anatómicas en víctimas de agresión sexual.	113
Tabla 10	Muestra de estudio de víctimas de agresión sexual por género de Enero – Agosto 2017	161
Tabla 11	Muestras de estudios representativos forenses analizados para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides	162
Tabla 12	Tipos de muestras representativas de estudio forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides	163
Tabla 13	Escala Tipo Likert	165
Tabla 14	Tabla de escala de fiabilidad de Alfa de Cronbach	168
Tabla 15	Prueba binominal para las variables	169
Tabla 16	Confiabilidad del instrumento de medición Variable 1	170
Tabla 17	Tabla de Alfa de Cronbach Variable 1	170
Tabla 18	Confiabilidad del instrumento de medición Variable 2	171
Tabla 19	Tabla de Alfa de Cronbach Variable 2.	171
Tabla 20	Análisis estadístico de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	173
Tabla 21	Análisis estadístico de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual	174
Tabla 22	Análisis estadístico de la diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	175
Tabla 23	Análisis estadístico de la aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente.	176



Tabla 24	Análisis estadístico de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	177
Tabla 25	Análisis estadístico de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	178
Tabla 26	Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	179
Tabla 27	.Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	180
Tabla 28	Análisis de prueba de interpretación citológica de la característica microscópica de los espermatozoides con el método citoquímico PAS	181
Tabla 29	Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	182
Tabla 30	Análisis estadístico de reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopía por microscopía en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	183
Tabla 31	Análisis estadístico de la observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	184
Tabla 32	Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra.	185
Tabla 33	Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por del agresor en este caso del volumen de semen eyaculado.	186
Tabla 34	Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical.	187
Tabla 35	Análisis estadístico de la forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito	188
Tabla 36	Análisis estadístico de la forma de estudiar la evidencia de agresión sexual mediante la técnica del doble hisopado cuyo procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable.	189
Tabla 37	Análisis estadístico de la forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado.	190
Tabla 38	Análisis estadístico del material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides.	191

Tabla 39	Análisis estadístico de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sabanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas.	192
Tabla 40	Análisis estadístico de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio.	193
Tabla 41	.Análisis estadístico de la manera de analizar la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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.	194
Tabla 42	Análisis estadístico de la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado.	195
Tabla 43	Análisis estadístico de lo importante que los procedimientos posteriores a la toma de muestra y tras realizar el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico.	196
Tabla 44	Análisis estadístico descriptivo de la variable 1	197
Tabla 45	Análisis estadístico descriptivo de la variable 2	198
Tabla 46	Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis General	199
Tabla 47	Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis: Específica 1	200
Tabla 48	Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis: Específica 2	201
Tabla 49	Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis: Específica 3	202
Tabla 50	Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis: Específica 4	203
Tabla 51	Resumen: Prueba de correlación de Rho de Spearman	204

## Lista de Gráfica

Grafico 1	Mapa de ubicación del Hospital Alberto Sabogal Soleguren	7
Gráfico 2	Muestra de estudio de víctimas de agresión sexual por género de Enero – Agosto 2017	161
Gráfico 3	Muestras de estudios representativos forenses analizados para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides	162
Gráfico 4	Tipos de muestras representativas de estudio forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides	163
Gráfico 5	Análisis estadístico de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	173
Gráfico 6	Análisis estadístico de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual	174
Gráfico 7	Análisis estadístico de la diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	175
Gráfico 8	Análisis estadístico de la aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente.	176
Gráfico 9	Análisis estadístico de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	177
Gráfico 10	Análisis estadístico de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	178
Gráfico 11	Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	179
Gráfico 12	.Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	180
Gráfico 13	Análisis de prueba de interpretación citológica de la característica microscópica de los espermatozoides con el método citoquímico PAS	181
Gráfico 14	Análisis de estadístico de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	182

Gráfico 15	Análisis estadístico de reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopia por microscopia en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	183
Gráfico 16	Análisis estadístico de la observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.	184
Gráfico 17	Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra.	185
Gráfico 18	Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por del agresor en este caso del volumen de semen eyaculado.	186
Gráfico 19	Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical.	187
Gráfico 20	Análisis estadístico de la forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito	188
Gráfico 21	Análisis estadístico de la forma de estudiar la evidencia de agresión sexual mediante la técnica del doble hisopado cuyo procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable.	189
Gráfico 22	Análisis estadístico de la forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado.	190
Gráfico 23	Análisis estadístico del material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides.	191
Gráfico 24	Análisis estadístico de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sábanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas.	192
Gráfico 25	Análisis estadístico de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio.	193
Gráfico 26	.Análisis estadístico de la manera de analizar la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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.	194
Gráfico 27	Análisis estadístico de la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado.	195

Gráfico 28 Análisis estadístico de lo importante que los procedimientos posteriores a la toma de muestra y tras realizar el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico.

196

## Lista de Figuras

Figura 1	Secuencia analítica Interpretación de resultados de identificación de semen	36
Figura 2	Foto microscópico de espermatozoide con objetivo 40x método directo, muestra con suero fisiológico	37
Figura 3	Imagen de un contador cámara de Makler y esquematización de las medidas de la cuadrícula y visualización en 200 aumentos	43
Figura 4	Tipo de movilidad de los espermatozoides. A. Progresivo rápido. B. Progresivo lento. C. No progresivo. D inmóvil.	44
Figura 5	Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides.	47
Figura 6	Espermatozoides morfológicamente anormales con colas dobles y cabezas dobles. Tinción de la muestra de semen (método Diff-Quik).	47
Figura 7	Métodos de Orientación	53
Figura 8	Fotografía perteneciente a tejido Renal. Coloración PAS. 200 X Capsula de Bowman.	60
Figura 9	Representación estructural del Mucopolisacaridos.	70
Figura 10	Representan dos posibilidades de constitución química de carbohidratos de membrana.	72
Figura 11	Oxidación de alcoholes.	74
Figura 12	Oxidación de la hexosa para obtener grupos aldehidos en los C 2 y C3. La F representa al reactivo Schiff	74
Figura 13	Reactivo de SHIFF. Producto de adición coloreado de tipo de dialdehido.	78
Figura 14	Degeneración fibrinoide de vasos sanguíneos (PAS 40x).	80
Figura 15	Representación estructural de la Isoformas MUC1	111
Figura 16	Fórmula para el cálculo de la muestra. Variable cualitativa población infinita.	160
Figura 17	Calculadora de muestra	160
Figura 18	Escala análisis de consistencia	162

## Resumen

La presente investigación tiene como objetivo principal, determinar la relación que existe entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA (Antígeno Prostático Específico) y citoquímica PAS (Ácido Periódico de Shiff) en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.

La investigación está enmarcada dentro del tipo de investigación aplicada, de diseño no experimental de nivel correlacional ya que en este caso la variable 2 es sometida a dos métodos, la inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS, para determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente; el primer método basada en la reacción antígeno anticuerpo y un segundo método fundado en la composición química de las células donde se haya la reacción de los mucopolisacaridos: ambas pruebas estandarizada y realizada en láminas porta objetos con carga positiva.

A partir de estos instrumentos metodológicos la presente investigación está constituida por 87 muestras: 19 hisopados secreción vaginal, 2 hisopados secreción anal, 2 hisopados secreción perianal, 10 prendas íntimas, 10 papel higiénico, 10 toallas higiénicas, 10 hisopados de la región corporal, 12 telas de algodón, 12 telas sintéticas. Posteriormente todas las muestras fueron procesadas en las láminas con carga positiva para la aplicación de la Inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS. La evaluación de láminas fue previamente validada por juicio de expertos, para mayor rigurosidad y confiabilidad de la investigación. Se empleó para la prueba de hipótesis el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 24.0. Concluyendo que esta investigación es proporcionar a la aplicación de técnicas de reconocimiento de confirmación de espermatozoides donde las muestras forenses relacionadas a la violencia sexual, remitidas al laboratorio de criminalística son procesadas con las técnicas de estudio permitiendo visualizar microscópicamente e identificando a los espermatozoide en el menor tiempo empleado y con la mayor sensibilidad y especificidad del producto encontrado sirviendo de apoyo a la labor pericial de nuestro país.

**Palabras Clave:** Inmunocitoquímica, citoquímica, antígeno prostático específico, ácido peryódico de Shiff, espermatozoides, líquido seminal, muestras forenses.

## **Abstract**

The main objective of this research is to determine the relationship between the application of the techniques of immunocytochemistry PSA (Prostate Specific Antigen) and cytochemistry PAS (Periodic Acid of Schiff) in the recognition and identification of sperm in forensic samples for sexual violence in the Alberto Sabogal Sologuren National Hospital, 2017.

The research is framed within the type of applied research, of non-experimental design of correlational level since in this case the 2 variable is subjected to two methods, PSA immunocytochemistry and PAS cytochemistry, to determine the presence of sperm microscopically; the first method based on the antibody antigen reaction and a second method based on the chemical composition of the cells where the reaction of the mucopolysaccharides has been carried out: both tests standardized and carried out on positively charged plates. From these methodological instruments the present investigation is constituted by 87 samples: 19 swabs vaginal secretion, 2 swabs anal secretion, 2 swabs perianal secretion, 10 intimate garments, 10 toilet paper, 10 sanitary towels, 10 swabs from the body region, 12 cotton fabrics, 12 synthetic fabrics. Subsequently, all the samples were processed in the positively charged sheets for the application of the PSA Immunocytochemistry and PAS Cytochemistry. The evaluation of films was previously validated by expert judgment, for greater rigor and reliability of the research. The statistical program IBM SPSS Statistics versión 24.0. was used for the hypothesis test. Concluding that this research is to provide the application of techniques of recognition of sperm confirmation where the forensic samples related to sexual violence, referred to the crime lab are processed with the study techniques allowing microscopic visualization and identifying the sperm in the minor time spent and with the highest sensitivity and specificity of the product found supporting the expert work of our country.

**Key words:** Immunocytochemistry, cytochemistry, prostate specific antigen, periodic acid of Schiff, spermatozoa, seminal fluid, forensic samples.



## I. INTRODUCCIÓN

La violencia sexual es un delito grave que atenta contra la libertad, la dignidad y la integridad de la persona manifestándose con actos agresivos que mediante el uso de la fuerza física, psíquica o moral que reduce a una persona a condiciones de inferioridad para imponer una conducta sexual en contra de su voluntad. (Ministerio de la Mujer y Poblaciones vulnerables 2012). Frente a este problema la investigación titulada: "APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017", tiene como finalidad proporcionar nuevas técnicas de reconocimiento y confirmación de los espermatozoides, donde las muestras remitidas al laboratorio de criminalística son analizadas en su identificación, aplicando las técnicas de inmunocitoquímica Antígeno Prostático Específico (PSA) y la citoquímica Ácido Periódico de Shiff (PAS) en el cual los hisopados vaginales, como los anales incluyendo los diferentes soportes de telas, donde se encuentra un 90% de casos relacionados con el delitos sexuales, son estudiadas en el menor tiempo empleado y con la mayor sensibilidad, especificidad y seguridad del producto encontrado, de este modo sirva de apoyo a la labor pericial en nuestro país. Por ello esta investigación presenta la siguiente organización:

Con relación al Capítulo I: Problema de investigación, planteamiento del problema, formulación del problema, Objetivos tanto general y específico, justificación de la investigación, delimitación de la investigación, limitaciones de la investigación.

En el capítulo II: Marco teórico, que incluye a los antecedentes de la investigación, bases teóricas de violencia de género y las conductas de las mujeres víctimas de violencia de pareja; también se presenta la formulación de

hipótesis; asimismo la operacionalización de variables e indicadores y definición de términos básicos.

En lo concierne al Capítulo III: Metodología, en el que se incluye el tipo y diseño de investigación, variables, población, muestra y muestreo; también tenemos a las técnicas e instrumentos de recolección de datos y las técnicas para el procesamiento de datos.

En el Capítulo IV: Presentación de resultados, análisis de resultados, se comprueban las hipótesis y se presenta la discusión de los resultados.

En el Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones, se plasman los aspectos más importantes, también diversas recomendaciones a seguir en base a la investigación realizada.

## DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ, identificadas con DNI N°. 09435522, declaro que la presente Tesis titulada: "APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017", se ha realizado requerido a la investigación desarrollada por el complejo trabajo de campo, del cual se ha implicado a bibliografía considerando los derechos de los autores, los cuales están mencionados en las referencias bibliográficas que es ubicada al final de la investigación. Por lo tanto, las averiguaciones e informaciones que contiene esta Tesis, para los aspectos legales y académicos es y será de mi entera responsabilidad.



---

**CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ**

## **CAPITULO I:**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1. Descripción de la realidad problemática**

Las violaciones sexuales son un delito frecuente en América Latina. El Perú es uno de los países con más altas tasas de denuncias por violaciones sexuales de la región y en donde la violencia sexual es un fenómeno extendido en todos los sectores económicos, grupos de edad y espacios urbanos y rurales.

El contexto en el que desenvuelve la Criminalística con el objetivo de comprobar el delito y descubrir al delincuente, científicamente. Tiene como finalidad el convertir los indicios y evidencias colectadas y estudiadas, en pruebas, las llamadas pruebas periciales. Por esta razón en el laboratorio Forense de la Dirección de Criminalística del Perú reciben muestras relacionadas con delitos en contra de la Libertad Sexual (violación), las mismas que son evaluadas y analizadas, específicamente las manchas de semen en diferentes tipos de soporte, donde los hisopados vaginales como los hisopados anales obtenidos por el médico legista y que muchas veces estas muestras

obtenidas presentan abundante contaminación bacteriana y que con lleva al error en el reconocimiento e identificación de los espermatozoides..

El procedimiento de estudio que desarrollaremos como técnica de reconocimiento e identificación de espermatozoides en el peritaje de violencia sexual es la inmunocitoquímica una técnica basada en la localización de moléculas específicas en células en este caso de los espermatozoides mediante el empleo de un biomarcador Anticuerpo Policlonal de conejo (IgG) que es el Antígeno específico de la próstata (PSA). Es una técnica que gracias al anticuerpo y a la estandarización de su protocolo se convierte en un método sencillo y muy eficaz del cual por la gran especificidad y alta afinidad del anticuerpo para reconocer el espermatozoide y unirse a ellas en base a la unión antígeno-anticuerpo hace que esta reacción sea observada microscópicamente convirtiéndose de esta manera en una técnica de confirmación y de certeza sin lugar a dudas por el hallazgo de los espermatozoides marcados en el espécimen forense investigado.

El siguiente estudio de reconocimiento e identificación de espermatozoides es la técnica citoquímica de PAS (Acido Periódico de Schiff). El uso de esta técnica en nuestra tesis está basada en el estudio de la composición química de las células cuyo principio del reactivo Schiff preparado es de ser un colorante incoloro pero que se torna rojo estable al contacto con los grupos aldehídos de los azúcares formado por la oxidación de los grupos oxhidrilo ( $-OH$ ) de dos carbonos cercano en los hidratos de carbono por acción del ácido periódico. Esta reacción presenta proporcionalidad entre la intensidad del color producido y el contenido hidratos de carbono, en este caso mucina poco estudiado del núcleo y cola del espermatozoide, permite una reacción y tinción estable del producto donde son preparados en lámina porta objetos con el fin de visualizar microscópicamente la identificación del espermatozoide en muestras forenses por violencia sexual dando como resultado un reconocimiento confirmatorio de procedimiento.

## **1.2. Identificación y formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿Qué relación existe entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?

### **1.2.2. Problemas específicos**

1. ¿Cómo se relaciona la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?
2. ¿Cómo se relaciona la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Schiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?
3. ¿Qué relación existe entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?
4. ¿Qué relación existe entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?

### **1.3. Objetivo de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar la relación que existe entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017

#### **1.3.2. Objetivo Específicos**

1. Determinar la relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.
2. Determinar la relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.
3. Evaluar la relación que existe entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.
4. Evaluar la relación que existe entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.

#### **1.4. Justificación y viabilidad de la investigación**

Cuando observamos y analizamos los elementos de prueba en una investigación o proceso penal que se haya iniciado ante la sospecha de un delito sexual, es común asociarlos con rastros de violencia, como por ejemplo, excoriaciones y hematomas en el cuerpo de la víctima o en lesiones localizadas en su zona genital, pudiendo pasar por alto aquellos indicios que resultan imperceptibles al ojo humano, como la presencia de muestras tricológicas, fibras e incluso fluidos corporales. A partir de estos indicios y de acuerdo con el principio de intercambio propuesto por Edmon Locard, indicando que: “siempre que dos objetos entran en contacto transfieren parte del material que incorporan al otro” y “Los restos microscópicos que cubren nuestras ropas y cuerpos son testigos mudos, seguros y fieles de nuestros movimientos y encuentros”, por lo que ante el contacto directo que, generalmente, se da en un delito sexual, existe la posibilidad de encontrar en el cuerpo de la víctima algún indicio incluso microscópico que permita la identificación del autor del ilícito.

La valoración de la prueba pericial en delitos de violación sexual presentada en la Corte Suprema de Justicia de la Republica en el Acuerdo Plenario N° 4-2015/CIJ-116, considera que en el examen médico legal en delitos sexuales; el profesional examinador, además de apreciar estas zonas físicas, deberá obtener todo vestigio material que se relacione con este delito. Del mismo modo Estevez, J. (2008) indica que, en la investigación de delitos sexuales, la búsqueda de semen es de gran importancia debido a que se puede utilizar un elemento de identificación como prueba de actividad sexual.

Esta última premisa es muy importante porque la investigación del semen, se encuentra circunscrita a la determinación citológica por la presencia de los espermatozoides en casos de presuntas víctimas de delitos sexuales y la técnica de confirmación o llamado también de certeza da sin lugar a dudas el hallazgo de los espermatozoides microscópicamente hallado en el espécimen investigado.



La importancia de este trabajo de investigación es que las técnicas de inmunocitoquímica (PSA) y la citoquímica PAS realizada en muestras forenses por violencia sexual obtenidos en diferentes tipos de soporte, incluyendo además de los hisopados vaginales como los hisopados anales, procedimiento ejecutado por el médico legista , ayuden al Fiscal con la adquisición de pruebas contundentes, llevar al acusado de estos hechos a que pueda ser juzgado como culpable o inocente dependiendo de los resultados obtenidos y así ayudar a hacer justicia ante estos actos deplorables, que afectan el bienestar físico, psíquico y social de la víctima, tanto a corto como a largo plazo.

## 1.5. Delimitación de la Investigación

**GEOGRÁFICA.** - El Hospital Alberto Sabogal Sologuren se encuentra ubicado en el Jr. Colina 1081, en el distrito de Bellavista, provincia constitucional del Callao.

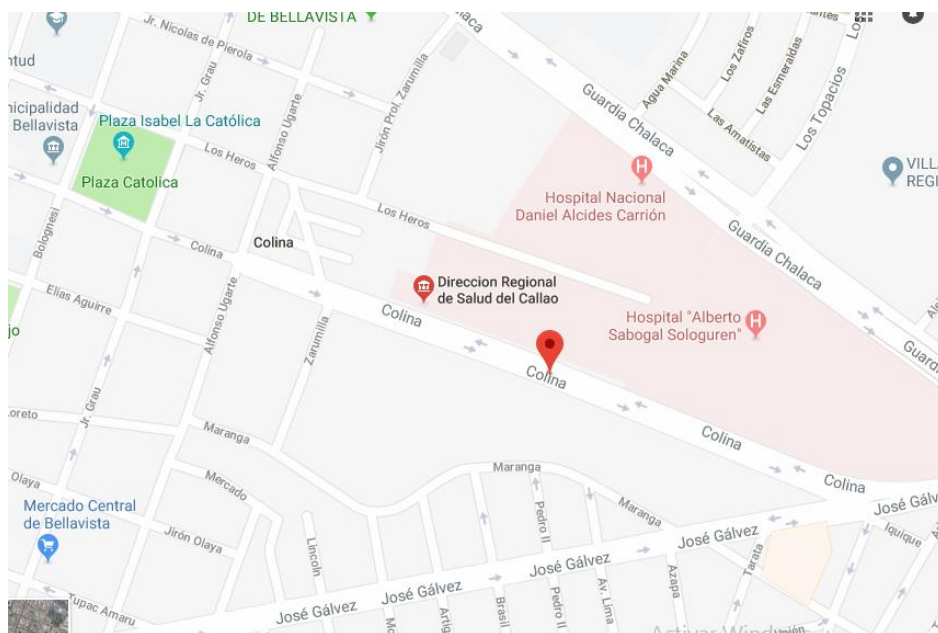


Gráfico N° 1 Mapa de ubicación del Hospital Alberto Sabogal Sologuren

Fuente: Google map. Bellavista 19-12-17

El 8 de setiembre de 1941 el Seguro Social inauguraba el primer hospital de esta institución ubicado en la Provincia Constitucional del Callao y que tenía el nombre de Policlínico Obrero. Dicho centro asistencial, actualmente denominado “Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren”, **atiende hoy a más de un millón de asegurados del primer puerto** y de distritos como Comas, Carabayllo, San Miguel, Bellavista, Ventanilla, Puente Piedra y centros de Huacho, Huaral, Paramonga, Barranca, Oyón y Raura. Teniendo los siguientes límites:

Por el oeste: limita con Dirección Regional del Callao.

Por el norte oeste: limita con el Hospital Daniel Alcides Carrión

Por el norte este: limita con la Av. Guardia Chalaca y Villa deportiva del Callao

Por el sur: limita con la Av. Colina y Av. José Gálvez

Por el sur este: limita con el ovalo Saloom

## **TEMPORAL**

La investigación se llevó a cabo entre los meses diciembre 2017 - marzo del 2018

## **TEÓRICA**

La violencia sexual es aquella que se manifiesta con agresiones a través de la fuerza física, psíquica o moral, rebajando a una persona a condiciones de inferioridad, para implantar una conducta sexual en contra de su voluntad. Este es un acto cuyo objetivo es someter el cuerpo y la voluntad de la víctima.

La valoración de la prueba pericial en delitos de violación sexual considera que al haber un delito sexual se produce un contacto físico, ya sea con una persona o un objeto, se produce un intercambio entre ambos agentes, lo que en criminalística se conoce como Principio de Intercambio.

Este principio Criminalístico, cuya paternidad se le atribuye al Criminalista francés Dr. Edmundo Locard (1877-1966), plantea que cuando dos cuerpos "A" y "B" interactúan, se produce un contacto inevitable entre dos elementos distintos, lo cual necesariamente genera una transferencia de elementos materiales, en muchos casos una transferencia mutua o intercambio, de evidencias físicas tangibles o intangibles.

Cuando se comete un delito ocurre un choque inevitable de elementos contrarios, se produce un intercambio de indicios materiales y evidencias físicas. Estos elementos contrarios son: El autor del hecho, el sitio del suceso, la víctima y los medios activos utilizados. Es decir que el

sujeto activo siempre deja algo de si en la escena del crimen y siempre se lleva algo consigo del sitio. ¿Qué dejo y que se llevó del sitio?

La Semenología forense es el estudio de los rastros de semen y manchas presentes en aquellos delitos cometidos contra la libertad sexual de las personas sean de sexo femenino y masculino e inclusive menores de edad.

El líquido seminal y los espermatozoides son encontrados con mayor frecuencia como indicios biológicos dejados por el agresor sobre la víctima y en el lugar de los hechos proveniente de la agresión sexual adquieren vital importancia por la información que brinda en la investigación en especial cuando el delito se consuma sin testigos por lo que actualmente existen procedimientos universales para su detección e identificación. Guía médico legal evaluación física de la integridad sexual (2da. versión – año 2012)

El Estudio pericial citológico en el reconocimiento e identificación del espermatozoide es una prueba de certeza y constituye un testimonio acusador irrefutable en casos en que se investiguen presuntos delitos sexuales, lo que justifica que resulte de sumo interés en Medicina Legal.

## **1.6. Limitaciones de la investigación**

**-Limitaciones internas:** Las muestras obtenidas para nuestro estudio son referidas después del área de microbiología y del servicio de Ginecología y una vez concluidas su evaluación por el personal encargado de las áreas en mención las muestras son utilizadas el mismo día para nuestro estudio.

**-Limitaciones externas:** El estudio de investigación es realizado en el Laboratorio de Anatomía Patológica y no en un Laboratorio Forense que podría reunir algunos requisitos diferentes para el estudio.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Antecedentes de la investigación**

Se han encontrado diferentes proyectos e investigaciones las cuales están relacionadas con el objeto de estudio del presente trabajo, se relacionan directa o indirectamente tanto con el problema de investigación como con los objetivos que se pretenden alcanzar. Dentro de estos antecedentes, se citan los siguientes:

##### **2.1.1. Antecedentes internacionales**

Los estudios realizados por **Sawaya y Rolim (2004)** en el Instituto Médico Legal de Curitiba-Paraná, los autores de este trabajo de investigación detallan que el antígeno prostático específico (PSA) es generalmente usado para detectar y monitorear cuantitativamente el desarrollo de cáncer de próstata por niveles en suero de esta proteína, del mismo modo es también encontrada en altas concentraciones en el semen. Conceptualmente refieren que el antígeno

específico de la próstata (PSA) es una glicoproteína producida por el tejido de la próstata y secretada en niveles altos en el fluido seminal. Además, lo describen principalmente como un antígeno específico de próstata y que más tarde fue observado su presencia en varios fluidos extra-prostáticos. Así mismo describen la evolución histórica de PSA en criminalística, así como también la información sobre los niveles de PSA ya descritos en los fluidos extra-prostáticos. Por ende, sus trabajos realizados por estos autores cuestionan si estos niveles pueden dañar la identificación forense de semen. Concluyendo que los niveles de PSA existentes en los fluidos extra-prostático no interfieren con el esperma en la investigación criminal y que la habilidad de los científicos forenses puede determinar de forma fiable la presencia de espermatozoides en los hisopos a través de la prueba de PSA.

Así mismo **Quispe, Tarifa, Solíz y Sierra (2010)** hace referencia a la inmediata actuación del médico legal, en la investigación forense en relación al fluido seminal en víctimas de violencia sexual, en el Laboratorio de Biología Forense; por lo que hace énfasis a la exploración física general y la búsqueda de indicios, puntos fundamentales para el diagnóstico certero por el laboratorio forense en delitos de abuso sexual. Se evalúa a 215 víctimas de violencia sexual por Medicina Forense y el Laboratorio Biología del Instituto de Investigaciones Forenses. Para este estudio aplicaron 3 métodos para la búsqueda de semen: Fosfatasa ácida, espermatozoides y Antígeno Prostático Específico (PSA), el mismo que es un marcador específico del varón. Ellos concluyen que la gran mayoría de denuncias de violencia sexual corresponden a delitos de violación y homicidio (91%) de los cuales el 55% de los casos fue sobre niñas de 4 a 17 años. Se analizaron 251 indicios entre hisopados vaginales, anales y prendas colectadas de la víctima, el 28% de los indicios estaban impregnados con sangre. Se detectó presencia de semen en el 60% de las víctimas: Fosfatasa ácida (37%), espermatozoides (25%) y PSA (35%), determinando una alta sensibilidad y especificidad de los métodos aplicados.

Mientras que, **Cisneros y Villarroel (2016)** realizan sus estudios aplicando ensayos inmunocromatográficos para la detección de proteína P-30 del cual presenta como uso comercial las pruebas como PSA-check-1; Seratec®

PSA Semiquant y One Step ABACard PSA. Su estudio se dirige al kit ABACard PSA debido a que es el más empleado es en área forense, ya que este reactivo utiliza anticuerpos monoclonales antiP-30 humanos que se unen al antígeno prostático específico (P-30) formando un complejo antígeno-anticuerpo. Se demuestra que el límite inferior de detección es de 4 ng/l, por lo que una muestra que contenga una cantidad igual o superior, es evidenciada por la prueba, determinando un resultado positivo. Sin embargo, ellos indican que la visualización microscópica de espermatozoides sigue siendo considerada la prueba definitiva para la demostración de espermatozoides en los laboratorios de biología forense y que las técnica histoquímica como Kernechtrol-Picroíndigocarmín KPIC o Árbol de Navidad se utiliza de forma corriente como tinción identificativa de células espermáticas, debido a que los métodos se caracterizan por discernir principalmente espermatozoides completos o cabezas de espermatozoide de células no espermáticas, bien células epiteliales o levaduras, que regularmente están presentes en las muestras procedentes de una agresión sexual.

Del mismo modo **Cuiza, C. (2012)** en su trabajo de investigación sobre la labor de la sección de biología forense en la investigación de delitos sexuales indica que los análisis de muestras biológicas desde la valoración médica y toma de muestra de la víctima, es el inicio del trabajo pericial en biología forense y centra en la investigación de semen o líquido espermático con la búsqueda microscópica utilizando la tinción específica "árbol de navidad", si el resultado es positivo se guarda las muestras hisopeadas para análisis de ADN. Además, agrega que la determinación antígeno prostático específico (PSA o p30), es un componente exclusivo del semen; su determinación se realiza con la técnica de ELISA que es altamente sensible en la detección de antígenos, pero se ve afectada por el tiempo en que los fluidos se encuentren en cavidades. La información de su trabajo concluye que los procedimientos investigación se ven influenciados directamente por el tiempo, siendo importante esta variable en la valoración de la víctima y la toma de muestras para su procedimiento en laboratorio en delitos sexuales.

**Cortez, B. y Logroño, K. (2015)** evaluaron casos forenses provenientes del Centro de Investigación de Ciencias Forenses de la ciudad de Ambato por Medicina Forense y el Laboratorio en el Ecuador. Los investigadores aplicaron 2 métodos de alta sensibilidad y especificidad para la búsqueda de semen: Proteína (P30), y Antígeno Prostático Específico (PSA), el mismo que es un marcador específico del varón. La gran mayoría correspondió a delitos de violación y homicidio (91%). Se detectó presencia de semen en el 60% de las víctimas: P30 (65%), PSA (35%). Se concluye que el estudio de manchas de líquido seminal constituye una prueba precisa y útil en la resolución de casos asociados a estos delitos. Las dos técnicas empleadas en el laboratorio forense son de gran validez; La prueba (PSA) es una de las más conocidas y utilizadas para la identificación del semen, se basa en la presencia de niveles altos de fosfatasa de origen prostático. Mientras que la prueba P30 está diseñada para la detención cualitativa de la proteína P30 en la identificación del semen porque constituye un marcador aceptado para la detención de líquido seminal, esta técnica es más específica en casos forenses porque indica en forma contundente que el fluido corporal es elemento de identificación humana, para eliminar sospechosos.

Finalmente, **Bouvet, Pavesi, Paparella, & Ombrella, 2017**; en su estudio titulado, Identificación de espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras donde el objetivo del presente estudio fue identificar espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras. Se aplicaron diferentes técnicas microscópicas como el microscopio óptico (MO), contraste de fase (CF), de luz polarizada (LP) y microscopio fluorescente (MF) con diferentes técnicas de tinción como el Papanicolaou, la Hematoxilina, Verde brillante para la identificación de espermatozoides con el microscopio óptico donde confirman la presencia de los espermatozoides enteros y fragmentados en las muestras de semen contaminadas con levaduras ( $P < 0.05$ ). A demás indica que el hallazgo de un espermatozoide es un estándar de oro en la ciencia forense, pero este caso no es de alta frecuencia, debido a la labilidad del espermatozoide frente a cambios osmóticos y a la deshidratación, que trae como



consecuencia la observación de sólo cabezas de los mismos. El espermatozoide es una célula con características morfológicas especiales, y aplicando diferentes coloraciones se observa intensamente teñido el núcleo y en forma tenue el acrosoma.

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

Según **López K. (2013)**. Sostiene que el reconocimiento e identificación de manchas de semen en diferentes soportes de interés forense, es primordial en la búsqueda de espermatozoides, indicando la gran importancia de su evaluación en criminalística ya que constituye una prueba precisa y útil en una correcta investigación pericial mediante una serie de normas o protocolos estandarizados; donde la investigación está asociado directamente a Crímenes de Índole Sexual. Su objetivo es el de reconocer e identificar los espermatozoides en las manchas de semen en diferentes soportes a través de una mejor técnica de tinción. Se evaluó ocho tipos de soportes, entre fibras de algodón y fibras sintéticas en el Laboratorio de Biología Forense de la Dirección de Criminalística del Perú, aplicando el Método Directo para manchas de semen con las coloraciones Gram y Cristal violeta. Su valor pericial en el reconocimiento de las manchas de semen en los diferentes soportes determinó que ambas técnicas de tinción pueden ser utilizadas en la Prueba de certeza (microscopía) teniendo en cuenta que la tinción Gram permite una mejor visualización y diferenciación de los espermatozoides con otros tipos de células y/o bacterias.

Los estudios realizados por **Pacheco, J. y Col. 2012**. Sobre la violencia contra la mujer; lo define como cualquier acto de agresión o abandono hacia la mujer que produzca o pueda producir daños o sufrimientos psicológicos, físicos o sexuales en la mujer, incluidas las amenazas de tales actos, la coerción o la privación arbitraria de la libertad, tanto en la vida pública como en la privada.

Además, en este trabajo los autores manifiestan que la evaluación médico legal de una persona que ha denunciado ser víctima de lesiones traumáticas corporales o de una violación sexual le compete al médico legista, en muchos

lugares de nuestro país no existe este profesional; y es el médico general o médicos de otras áreas quienes realizan este examen en diferentes centros de salud u hospitales en las capitales de provincia del país. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es enseñar la forma de redactar la historia clínica o informes médicos en los casos de mujeres víctimas de agresión física y/o sexual que hayan denunciado el hecho. Además, de indicar los procedimientos que se deben realizar antes, durante y después de este examen clínico específico, junto con la correcta obtención de evidencias corporales de interés Criminalística y el manejo clínico de personas.

Sin embargo, debemos mencionar también la valoración de prueba que los autores en este artículo indican, sobre los exámenes de laboratorio y la importancia de la secreción de frotis vaginal de la víctima de agresión sexual, que se coloca una lámina portaobjeto añadiendo una gota de solución salina y este bajo microscopio identificar espermatozoides como prueba confirmatoria de la Violación Sexual. Además, incluye la prueba de embarazo en sangre (b-hCG) para diagnosticar embarazo como también los exámenes serológicos como RPR para descartar Sífilis, Antígeno Australiano para descartar Hepatitis y el VIH para el descarte de SIDA.

## 2.2. Bases Teóricas

### 2.2.1. Variable 1

**Estudios biológicos de fluidos seminales. (Determinación del semen):** El objetivo principal del examen biológico es detectar la presencia de semen en las muestras recogidas, como prueba de actividad sexual.

El semen tiene dos fracciones: La porción celular o esperma (5% del volumen), y la porción líquida o plasma seminal (95% de volumen), el semen en conjunto es de aspecto lechoso, opalescente, ligeramente amarillo, posee un pH. de 7.2-7.3 y está compuesto por el plasma seminal y los espermatozoides que pueden ser separados por centrifugación.

El rango de conteo normal de espermatozoides está entre 20 millones/ml y 200 millones/ml. El volumen se considera normal cuando es entre 2 y 6 ml.

Es importante tener en cuenta que el líquido seminal es producto de la secreción de tres glándulas distintas del sistema genital y sus composiciones son diferentes. La primera proviene de las glándulas de Cooper, de pH 8.4 que neutraliza la acidez de la uretra. La segunda proviene de la fracción prostática y por último el líquido segregado por las vesículas seminales.

Para la investigación de las manchas seminales existen una cierta variedad de estudios que a continuación serán desarrollados.

La presencia de un espermatozoide completo es la prueba irrefutable de semen. Es muy común encontrar en las muestras fragmentos de espermatozoides, ya sean cabeza o cola, pero debido a la contaminación con la que generalmente se encuentran estos restos, muchas veces estos fragmentos pueden ser confundidos con esporas y bacterias.

Patologías: Hay que tener en cuenta, que en ciertas patologías no se puede obtener espermatozoides en el examen microscópico, tales son los casos de: oligospermia, azoospermia, hipospermia, aspermia.

Marcadores: Se han clasificado los marcadores del semen en tres grandes grupos:

- Marcadores que, por su alta concentración, pueden determinarse fácilmente en manchas, frotis o aspirado vaginal: Fosfoglucomutasa (PGM), La peptidasa A y la Fosfoglucoisomerasa (PGI).
- Marcadores que, por su moderada concentración, y que puede determinarse solo en ciertas condiciones: Adenilato quinasa (AK), amilasa, esterasa D, glioaxalasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6 PGD) y la transferrina.
- Marcadores de escaso valor, porque se hallan en concentraciones muy bajas en el semen: alfa-1-antitripsina, inmunoglobulinas (GM Inv), fosfoglucomutasa 3 (PGM 3) y la diaforasa espermática.
- La colina seminal, también se encuentra en altas concentraciones, ésta puede ser precipitada utilizando agentes reactantes o mediante electroforesis, identificándose cristales de colina.

#### **Pruebas bioquímicas para el estudio del semen:**

Los procedimientos utilizados en este estudio se basan en interacciones bioquímicas del sistema inmunológico: antígeno - anticuerpo y enzima - sustrato.

a) Fosfatasa ácida prostática (FAP): enzima presente en el plasma seminal, producida por la próstata, tiene una concentración 400 veces mayor que en otros fluidos corporales. La FAP cataliza en medio ácido la hidrólisis del alfa naftil fosfato. El alfa naftol producido, reacciona con una sal de diazonio formando un cromógeno púrpura. Tiene una sensibilidad de 67%, sin embargo, a las 48h su sensibilidad disminuye a 40%, puesto que a partir de las 14 horas desaparece progresivamente. Constituye una prueba presuntiva.

b) Antígeno Prostático específico (PSA): glicoproteína producida por las células epiteliales prostáticas. Sólo está presente en muy bajas concentraciones en algunos fluidos corporales como: orina, suero, leche materna y líquido amniótico Se utiliza como marcador para semen a través de inmunoensayo que ofrece un método alternativo rápido y fiable de detección de PSA.

Tiene una sensibilidad de 99.4%, y a las 48h su sensibilidad disminuye a 96%, puesto que a partir de las 27 horas desaparece progresivamente. Es una prueba confirmatoria.

c) Semenogelina I y II: Son los principales componentes proteicos en el semen y se producen principalmente en las vesículas seminales. Representan la consistencia gelatinosa del semen recién eyaculado debido a interacciones a través de puentes disulfuro. La presencia de Semenogelina ha sido demostrada en músculo esquelético, colon, riñones, y la retina, así como en el carcinoma de pulmón. Su concentración es 10 veces más que el PSA (19 mg/mL – 1.92 mg/dL). La identificación de Semenogelina humana mediante la prueba de tira reactiva esta disponibles en la forma de la RSID-semen test, con resultado en 10 minutos, con una sensibilidad y especificidad del 100% con resultados positivos hasta las 72 horas de hecho. Es una prueba confirmatoria. ( **Instituto de medicina legal del Perú, 2012, págs. 94-106**)

**Asociación de resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual.** Los casos de violaciones sexuales generalmente son crímenes sin testigos, por lo que la evidencia científica forense, se convierte en una herramienta decisiva para esclarecer estos hechos delictivos. En el sistema de justicia guatemalteco, el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala –INACIF-, recibe las solicitudes de análisis genético comparativo para asociar a un sospechoso de violación sexual, víctima y/o escena del crimen. Para este fin, INACIF utiliza una combinación de métodos bioquímicos e inmunológicos para determinar la presencia de semen y espermatozoides. En primer lugar, se determina la presencia de la enzima fosfatasa ácida (FA), como indicador de la presencia de semen junto con la determinación de proteína seminal humana P-30, utilizando la prueba One Step ABACard PSA®, que determina la presencia de fluido seminal por inmunocromatografía. Para observar la presencia de espermatozoides al microscopio se utiliza la tinción de árbol de navidad (AN). Los análisis genéticos forenses son eminentemente comparativos, por lo que, al momento de contar con muestras provenientes de sospechosos, indicios de la escena y muestras de la víctima, estos son sometidos a un proceso analítico que incluye: extracción de ADN, cuantificación, amplificación y tipificación (electroforesis capilar). El

objetivo de dichos análisis, es determinar si el perfil genético que se obtenga de los indicios recuperados de la escena, coincide con el perfil genético del sospechoso.

Los indicios biológicos relacionados con delitos sexuales generalmente involucran una mezcla de fluidos de la víctima y el sospechoso, por ejemplo, en un hisopado vaginal se recuperan células epiteliales de la víctima y semen del sospechoso. Para separar el ADN proveniente de los mismos, se utiliza un procedimiento denominado extracción diferencial, en la cual, el ADN de las células epiteliales (presumiblemente de la víctima), es extraído con dodecilsulfato sódico (SDS), y proteinasa K. Luego de separar por centrifugación, el sobrenadante que contiene el ADN de las células epiteliales -fracción femenina-, se extrae a partir del sedimento, el ADN de las células espermáticas con una mezcla de SDS, proteinasa K y ditioneitol (DTT), -fracción masculina-. También se extrae el ADN proveniente de las muestras de la víctima y el sospechoso utilizando el método Chelex. El ADN obtenido, es cuantificado utilizando el kit Quantifiler Human®, a través de PCR en tiempo real. Conociendo la cantidad y calidad de ADN presente en las muestras analizadas, el mismo es amplificado, utilizando los kits Identifiler Plus® y/o Y-filer® en una reacción por PCR. Finalmente, se obtiene el perfil genético de las muestras analizadas, realizando una electroforesis capilar.

Los perfiles genéticos obtenidos se cotejan realizando un estudio comparativo, si se presenta una inclusión (coincidencia entre el perfil genético del sospechoso y el perfil genético de los indicios), los datos son analizados estadísticamente para establecer la razón de verosimilitud o tasa de probabilidad comúnmente conocido como Likelihood Ratio (LR), para reportar la tasa de probabilidad de coincidencia entre dos perfiles genéticos.

El presente estudio determinó la asociación existente entre los resultados obtenidos de los análisis de FA, P-30 y la tinción de AN y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual en 137 casos analizados por INACIF de enero de 2010 hasta septiembre del 2011. Para establecer dicha asociación, se elaboraron tablas de 2x2, determinando los valores de OR, Chi cuadrado ( $X^2$ ) y “*p*”, con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Los

resultados mostraron que el análisis que presenta mayor asociación con la obtención de perfil genético, es la detección de proteína seminal humana P-30 con un OR de 6.79 (IC 95% = 1.17-38.58),  $X^2$  5.89 y “*p*” de 0.018. En adición, se estableció que tanto la detección de la enzima FA ( $p = 0.037$ ), proteína seminal P-30 ( $p = 0.018$ ), y la observación de espermatozoides a través de la tinción de AN ( $p = 0.027$ ), muestran asociación estadísticamente significativa con la obtención de perfiles genéticos de sospechosos. Así mismo, se estableció una frecuencia de obtención de perfiles genéticos de 75.2%, siendo las prendas de vestir íntimas femeninas, los indicios que presentaron mayor coincidencia entre la detección de fluidos masculinos y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos, con una frecuencia de 88.37%. **(García, Asociación de resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual., 2012, págs. 4-14)**

Estudio comparativo entre la determinación de PSA total y p30 para la valoración de líquido seminal en casos forenses: La violencia sexual es un problema de salud pública y de justicia social. La inmediata actuación médico legal, la exploración física general y la buena colecta de indicios, son fundamentales para el diagnóstico certero por el laboratorio forense. Se evaluó durante octubre 2015 a marzo 2016 en casos forenses en el Centro de Investigación de Ciencias Forenses de la ciudad de Ambato por Medicina Forense y el Laboratorio. Se aplicaron 2 métodos de alta sensibilidad y especificidad para la búsqueda de semen: Proteína (P30), y Antígeno Prostático Específico (PSA), el mismo que es un marcador específico del varón. La gran mayoría correspondió a delitos de violación y homicidio (91%). Se detectó presencia de semen en el 60% de las víctimas: P30 (65%), PSA (35%). El estudio de manchas de líquido seminal constituye una prueba precisa y útil en la resolución de casos asociados a delitos. Las dos técnicas empleadas en el laboratorio forense son de gran validez; La prueba (PSA) es una de las más conocidas y utilizadas para la identificación del semen, se basa en la presencia de niveles altos de fosfatasa de origen prostático. Mientras que la prueba P30

está diseñada para la detención cualitativa de la proteína P30 en la identificación del semen porque constituye un marcador aceptado para la detención de líquido seminal, esta técnica es más específica en casos forenses porque indica en forma contundente que el fluido corporal es elemento de identificación humana, para eliminar sospechosos. ( **Cortez & Logroño, 2016**)

Antígeno específico de próstata en fluidos biológicos: aplicación forense: El antígeno específico de la próstata (PSA) es una glicoproteína producida por el tejido de la próstata y secretado en el plasma seminal en niveles elevados. El PSA se utiliza ampliamente como un producto biomarcador del cáncer y como un marcador forense. El PSA se describió originalmente como un Antígeno específico de la próstata. Posteriormente, el PSA se observó en una variedad de fluidos extra prostáticos. En esta revisión, se sintetizó su historia evolutiva del PSA y se evaluó información disponible sobre los niveles del PSA en fluidos no prostáticos. Este artículo apunta a discutir si estos niveles pueden dañar la identificación forense del semen. ( **Sawaya & Rolim, 2004, págs. 109-116**)

Sistema especializado integral de investigación en medicina legal y ciencias forenses. Manual de procedimientos de laboratorio de biología forense: Protocolo de tinción “árbol de navidad” para identificación de espermatozoides: El semen está constituido por espermatozoides y líquido seminal. Entre el 15 – 20 % de volumen proviene de la próstata, 60 – 70 % de las vesículas seminales y solo el 10 % proviene del epidídimo. El semen es un líquido viscoso de color blanco grisáceo y opalescente, su pH varía entre 7.3 y 7.8 sus amortiguadores fosfatos y bicarbonato de sodio contribuyen a proteger a los espermatozoides del pH vaginal. Como elemento celular característico del semen se encuentran los espermatozoides, sin embargo, el cuadro celular es mucho más complejo: presenta células gigantes, células epiteliales, leucocitos, células prostáticas, cilindros testiculares y bacterias, contiene de 70 a 150 millones de espermatozoides por ml.



El espermatozoide humano maduro mide 60um de largo y es una célula con movimiento activo, está formado por una cabeza de forma oval vista de frente y forma de pera vista de perfil con el extremo angosto orientado hacia adelante, una pieza intermedia que contiene mitocondrias y una cola formada por nueve filamentos que rodean a otros dos centrales. La mayor parte de la cabeza está ocupada por el núcleo, cuya cromatina está condensada; 2/3 del núcleo están cubiertos por el acrosoma. Microscópicamente se compone de cuatro secciones: el cuello, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal con diferencias estructurales. La vida aproximada del espermatozoide en canal endocervical es de 114 h, en fondo de saco vaginal es de 120 h, rectal 65 h, anal 46 h y en la boca 6 h, en cadáveres no existen referencias bibliográficas en cuanto al tiempo posible de encontrarlos vivos.

El tiempo de permanencia de los espermatozoides en la cavidad vaginal varía dependiendo de presencia de menstruación, infecciones vaginales, el pH vaginal, lavado vaginal, el ejercicio físico y la cantidad de espermatozoides eyaculados. La defecación, afecta el tiempo de permanencia de los espermatozoides en la cavidad anal. La mezcla de estas variables hace que en general, los espermatozoides puedan detectarse en vagina hasta tres días después del coito.

Sin embargo, en la literatura relacionada con la investigación forense, se han observado algunos casos en los cuales los espermatozoides han sido detectados hasta seis días después del coito, en cadáveres no existen referencias bibliográficas en cuanto al tiempo posible de encontrarlos vivos, pero se debe considerar su afectación por la putrefacción.

## **OBJETIVO**

Determinar la presencia de espermatozoides en las muestras obtenidas por agresión sexual, atentado al pudor, escena del hecho y otros, utilizando la tinción "Árbol de Navidad" para identificación de espermatozoides como prueba confirmatoria.

## **MUESTRA REQUERIDA**

Las muestras y evidencias en las que se determina la presencia de espermatozoides son: frotis de hisopados genitales, para genitales y extra genitales.

## **PROCEDIMIENTO**

1. Visualizar en la placa donde se encuentra el frotis y delimitar el frotis con lápiz demográfico.
2. Fijar el frotis a calor seco o exponerlo a la llama directamente.
3. Colocar unas cuantas gotas (que cubra el frotis) de la solución Kernechtrot (rojo nuclear) y dejar actuar por 20 minutos (Reactivo 1).
4. Lavar con agua destilada.
5. Colocar unas cuantas gotas (que cubra el frotis) de la solución picroindigocarmine y dejar actuar de 10 a 15 segundos (Reactivo 2)
6. Aclarar el frotis con etanol al 95 %.
7. Dejar secar y montar la placa.
8. Observar en lente 40 X

## **OBSERVACIÓN**

En el espermatozoide, el material nuclear se tiñe de color rojo o rojo/púrpura, el cuerpo de los espermatozoides se observa de forma ovalada y teñido de rojo con un fondo rosado ligero, el acrosoma del espermatozoide se tiñe de color rojo ligero, la región media y la cola de los espermatozoides se tiñen de color verde o azul verdoso. (Campbell RJ Dpto. de Ciencias Forenses, Sección Biología Forense Virginia). Es necesario contar con un control positivo de espermatozoides y registrar el resultado mediante una fotografía para guardar como fotografía digital e imprimirla para adjuntar al expediente del caso.

## **RESULTADOS**

Se reporta como "PRESENCIA O AUSENCIA DE ESPERMATOZOIDES"  
Cuando el material celular es insuficiente se puede reportar como "MATERIAL INSUFICIENTE PARA EMITIR UN RESULTADO"

## **LIMITACIONES**

Por la naturaleza de la muestra y el tratamiento que se da en la preparación de los extractos es posible observar morfologías atípicas tales como

la ausencia de cola. **(Fiscalía General del Estado. Ecuador, 2014, págs. 17-19)**

Aspectos relevantes en la toma de muestra del semen: En la búsqueda de semen en escena de crimen, debe dársele mayor importancia a la ropa interior de la víctima y del sospechoso, sabanas, toallas, papel sanitario, pañuelos desechables o de algobón, piso, asientos de auto, etc.

Los procedimientos de toma de muestra de sitios anatómicos (diferentes partes del cuerpo) del ofendido, en caso de delitos de índole sexual deben ser realizados por personal médico calificado.

En estos casos el tiempo es un elemento de vital importancia para la recuperación de material biológico útil para realizar una identificación del imputado, para esto se deben tomar en como criterios importantes los siguientes aspectos:

- Toma de muestras realizadas entre 3 y hasta 6 días después del ataque sexual, puede ofrecer resultados negativos

- Se debe evitar que la (el) ofendido se bañe o se realice lavado vaginal, anal, oral, o donde el mismo haya manifestado que hubo ataque sexual, ya que esto afecta de manera importante la presencia de semen.

- La muestra se debe trasladar lo más pronto posible al laboratorio y al (la) ofendido a la clínica del médico forense.

#### *Identificación de semen:*

Para llegar a la identificación del semen, se llevan a cabo tres pruebas, las cuales se realizan de acuerdo al orden que están descritas a continuación.

##### *1) Determinación de fosfatasa acida*

La fosfatasa acida es una enzima que está presente en el semen y su origen es la glándula prostática. Esta enzima es muy lábil (sensible), y pierde actividad dentro de las primeras 10 horas.

Fundamento químico para su detección: La fosfatasa acida reacciona con el alfa naftil fosfato, liberando naftol, y dando una coloración vino tinto.

Falsos positivos: Es cuando se presentan reacciones positivas sin la presencia de la fosfatasa ácida. Esta reacción se presenta cuando se encuentran

presentes en los indicios contaminantes bacterianas como E. Coli, Proteus y levaduras.

## *2) Determinación de proteína p-30*

El antígeno prostático específico (PSA) o p-30 es una proteína que inicialmente se pensó que era específica y que tiene su origen en el epitelio que recubre la Gándula prostática. Pero ahora se sabe que se encuentra también presente en orina femenina, leche materna, líquido amniótico, pero en menores cantidades.

Varias metodologías son usadas para su detección, una puede ser por inmunocromatografía, que actúan con el anticuerpo específico. La sensibilidad de estos kits comerciales y es de 2 ng/ml de PSA. 3) *Observación microscópica de espermatozoides*

Para poder observar e identificar los espermatozoides es necesario hacer uso del microscopio, previo haber realizado un extracto del indicio a investigar, del cual se realiza un frote en una laminilla de vidrio llamada portaobjetos, el cual es coloreado con una tinción especial llamada "Tinción de Árbol de Navidad". Lleva su nombre por los diferentes colores que son rojo y verde que se tiñen los espermatozoides.

La tinción de la laminilla se realiza con una técnica especial, aplicando los colorantes Rojo rápido nuclear, luego se aplica el pícrico índigo carmín. Se observa al microscopio. El núcleo se colorea de color rojo, y el acrosoma de color verde.

### *Morfología el espermatozoide:*

Cabeza oval de 4 a 6 micras contiene material genético haploide y acrosoma. Su cola constituye en 90% del total de largo. Su función es la motilidad, contiene las mitocondrias. Especies con morfología similar, conejo, primates carnero.

**Tabla 1.**

Interpretación de resultados de Fosfatasa acida versus P-30 para la identificación de semen

ESPERMATOZOIDES	FOSFATASA ACIDA	P-30	INTERPRETACION
SE OBSERVARON	SE DETECTO	SE DETECTO	ES SEMEN
SE OBSERVARON	NO SE DETECTO	NO SE DETECTO	ES SEMEN
NO SE OBSERVARON	SE DETECTO	SE DETECTO	ES SEMEN
NO SE OBSERVARON	NO SE DETECTO	NO SE DETECTO	ES SEMEN
NO SE OBSERVARON	NO SE DETECTO	NO SE DETECTO	NO ES SEMEN
NO SE OBSERVARON	SE DETECTO	SE DETECTO	ES SEMEN

*Fuente: Formación criminalística enfoque pericial algunos aspectos de la investigación científica forense. Estévez, 2011, págs. 24-30*

En la búsqueda microscópica del espermatozoide, los encontramos completo, cabeza y cola, en frotos en fresco realizados directamente de la toma de la muestra en víctimas. Encontramos solamente la cabeza, cuando se trata de frotos realizados de muestras tomadas de indicios, del cual se toma un pedazo para su extracción y después centrifugación, para concentración de la misma. **(Estévez, 2011, págs. 24-30)**

### **Muestra**

La inmunocitoquímica (ICC) se puede realizar en la mayoría de las muestras de citología, incluyendo aspiraciones con aguja fina (FNA), fluidos serosales, frotis de Papanicolaou, y lavar y cepillar las muestras (2-4). Si la muestra de células es adecuada, uno debería prepare bloques de células, ya que representan las muestras ideales para ICC. Todo también a menudo, sin embargo, la muestra de células se limita a pocos frotis o citocentrífuga preparativos. De hecho, la necesidad de realizar ICC generalmente surge solo después de revisando las diapositivas fijas y teñidas con Papanicolaou. En tales casos, el cubreobjetos se quita y el ICC simplemente se puede realizar en el anterior Diapositiva teñida sin la necesidad de decolorar.

### **Consejos**

- Los preparados de filtro no son adecuados para ICC porque los filtros absorben reactivos inmunológicos y el cromógeno. Esto causa inaceptable tinción de fondo. Las preparaciones de filtro también se desprenden fácilmente de la diapositiva durante los pasos de lavado.

- La citocentrifugación de fluidos serosos con alto contenido de proteína puede causar precipitación de una película proteínica sobre el material celular, evitando de ese modo penetración adecuada de reactivos. En tales casos, un breve lavado de las células por solución salina isotónica antes de la centrifugación eliminará el exceso de proteína.

- Las aspiraciones finas de aguja y los fluidos de la cavidad corporal con exceso de sangre pueden interferir con ICC. Estos ejemplares pueden conservarse en solución Saccomanno, que no solo fija la muestra, sino que también lisa los glóbulos rojos.

- Si el número de diapositivas es limitado, se podría utilizar una diapositiva que era negativo para que un marcador se restaure con un segundo anticuerpo.

- Aunque la eliminación del cubreobjetos de vidrio de los portaobjetos previamente teñidos es relativamente simple, algunos cubreobjetos de plástico y película líquida no son fáciles extraíble y puede interferir con el rendimiento de ICC. **(Parvin Ganjei & Mehrdad, 2007, págs. 3-6)**

### **Fijación**

Igualmente, buenos resultados de ICC podrían lograrse en muestras citológicas fijadas en Alcohol isopropílico al 95%, formalina tamponada, formol-acetona o una mezcla de etanol y formalina. Una breve fijación en cualquiera de los fijadores anteriores es adecuada para la mayoría de las preparaciones citológicas (2).

### **Consejos**

- Las muestras secadas al aire no son muestras óptimas para la CPI de la mayoría de citoplasmas y marcadores nucleares. Además, la mayoría de las muestras secadas al aire están manchadas con los métodos Diff Quick o

similares de Romanowsky. Estas manchas también pueden interferir con los procedimientos posteriores de ICC.

- Similar a muestras histológicas, fijación prolongada de muestras de citología en formalina (semanas o meses) puede resultar en la pérdida gradual de su antigenicidad. Fijación prolongada en fijadores a base de alcohol, en la otra mano, no es un problema importante.

### **Evaluación de resultados**

El sello distintivo de una verdadera reacción positiva de ICC es la distribución heterogénea de tinción granular nítida dentro de células individuales o entre un grupo de células.

Dependiendo del antígeno, la reacción se puede ver en la membrana celular, ocupan todo el citoplasma, se limitan al área perinuclear o aparecen intranuclear. Con raras excepciones, manchas difusas de color marrón pálido monótono de células es con toda probabilidad no específico.

### **Reacciones falsas positivas**

Similar a los hallazgos en histopatología, una fuente común de falsos positivos las reacciones en ICC incluyen la tinción inespecífica de triturado, degenerado, y células necróticas. Histiocitos, macrófagos, células en mitosis y tumor las células gigantes también pueden mostrar reacción positiva falsa (2). Grande, tridimensional los grupos celulares en FNA, cepillado o muestras de citocentrífuga pueden atrapar reactivos inmunológicos y dar lugar a resultados positivos inespecíficos. En tales casos, la evaluación de una reacción positiva debe limitarse a células o grupos bidimensionales.

### **Resultados falsos negativos**

En ausencia de controles internos, la verdadera naturaleza de una reacción negativa en material citológico es difícil de verificar (5). En consecuencia, resultados negativos en ICC no son tan significativas como las reacciones positivas.

### **Tinción de fondo**

A diferencia de las secciones histológicas, la tinción de fondo inespecífica no es un problema principal en material citológico. De hecho, la mayor parte de

lo que parece ser una reacción no específica en el fondo de la diapositiva en la realidad representa verdadera.

### **Evaluación de resultados**

La tinción, por ejemplo, de una reacción de fondo para tiroglobulina en una FNA de la tiroides o una reacción de la cadena ligera de inmunoglobulina en un fluido seroso

Refleja la presencia normal y esperada de las respectivas proteínas en la muestra. Del mismo modo, cuando las muestras contienen células con membranas delicadas y frágiles. Las membranas, los antígenos intracitoplásmicos pueden liberarse mediante el acto de untar. Estos pueden aparecer como tinción de fondo no específica. Ejemplos incluyen tinción de fondo para la inhibina en neoplasmas de la corteza suprarrenal y la reacción de proteína S100 en FNA de tumores de células granulares. En el otro mano, las células en citología fluida pueden mostrar una tinción inespecífica de la membrana para un antígeno que está presente en el fluido, pero no es elaborado por esas células (es decir, reacción de membrana citoplasma inespecífica de células mesoteliales en una efusión de la cavidad corporal para inmunoglobulinas). Por lo tanto, solo nuclear o las reacciones intracitoplasmáticas son aceptables como verdaderamente positivas porque cualquier célula que flota en un fondo de este tipo puede mostrar manchas en la membrana de la superficie independientemente de si elabora ese antígeno o no. **(Parvin Ganjei & Mehrdad, 2007)**

### **Principios básicos de inmunohistoquímica**

Los patólogos quirúrgicos han reconocido desde hace tiempo su falibilidad, aunque no siempre la han publicitado.

Sin embargo, han buscado medios más seguros para validar los juicios morfológicos. Una variedad de "especiales las manchas" se desarrollaron para facilitar el reconocimiento y el diagnóstico celular; la mayoría de estas primeras manchas se basaron en reacciones químicas de componentes de células y tejidos en secciones congeladas (histoquímica). En ciertas circunstancias, estas manchas histoquímicas demostraron ser de valor crítico en la identificación



celular específica. Con mayor frecuencia, sirvieron simplemente para resaltar o enfatizar las características celulares o histológicas que respaldaban una interpretación particular sin proporcionar una confirmación verdaderamente específica. Cuando se creó el nuevo campo de inmunohistoquímica combinando inmunología con histoquímica, se generó una amplia variedad de tinciones especiales verdaderamente específicas. Este tema, que ha sido discutido en miles de artículos, será discutido en este libro.

Los objetivos de IHC son similares a los de la histoquímica. De hecho, IHC se basa en los fundamentos de la histoquímica; no reemplaza la histoquímica, sino que más bien sirve como un valioso adjunto que amplía en gran medida la variedad de componentes tisulares que se pueden demostrar específicamente dentro de las secciones de tejido u otras preparaciones celulares. Como enfatizaron los pioneros en este campo de la morfología funcional, "el objeto de toda tinción es reconocer microquímicamente la existencia y distribución de sustancias de las que hemos sido conscientes macrocientíficamente". El principio crítico básico de IHC, como con cualquier otro método de tinción especial, es una localización visual nítida de los componentes diana en la célula y el tejido, basándose en una relación señal / ruido satisfactorio. La amplificación de la señal al tiempo que se reduce la tinción de fondo no específica (ruido) ha sido una estrategia importante para lograr un resultado satisfactorio que sea útil en la práctica diaria. Después de más de dos décadas, los avances en IHC han proporcionado un enfoque factible para realizar inmunotinción en tejidos procesados rutinariamente, de modo que este método es ahora "rutinario" para la realización de "tinciones especiales" de IHC en laboratorios de patología quirúrgica que utilizan tejidos FFPE

Sin embargo, las demandas de reproducibilidad mejorada y de cuantificación han llevado a un reconocimiento creciente de que IHC tiene el potencial de ser más que una mancha especial. Si se controla adecuadamente en todos los aspectos de su rendimiento, IHC puede proporcionar un inmunoensayo basado en tejido con la reproducibilidad y las características cuantitativas de una prueba ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), que no solo detecta la presencia de un "analito" (proteína o antígeno)

pero también proporciona una medida precisa y confiable de su cantidad relativa o real (vea Control de calidad y estandarización).

### **Técnicas de recuperación de tejidos, procesamiento y recuperación de antígenos**

La siguiente sección refleja la práctica actual, con formalina como el fijador común. Recomendaciones para una mayor documentación ya ha sido enfatizada.

La preparación tisular consiste en la fijación, la deshidratación posterior y la inclusión en cera de parafina para proporcionar una matriz rígida para seccionar. Los tejidos que se van a incrustar en cera de parafina se fijan primero para optimizar preservación, un proceso que afecta profundamente los resultados morfológicos e inmunohistológicos. El fijador ideal para los estudios de IHC no solo debe estar disponible, sino que también debe utilizarse ampliamente para maximizar el rango y la cantidad de muestras disponibles para los estudios de IHC. El fijador debe preservar la integridad antigénica y limitar la extracción, difusión o desplazamiento del antígeno durante el procesamiento posterior.

Además, debe mostrar una buena conservación de los detalles morfológicos después de la inclusión en un medio de soporte (por ejemplo, parafina).

Los fijadores comunes utilizados en histopatología se dividen en dos grupos: fijadores de coagulantes, como etanol, y fijadores de reticulación, como el formaldehído. Ambos tipos de fijador pueden causar cambios en la configuración estérica de las proteínas, que pueden enmascarar los sitios antigénicos (epítomos) y afectar negativamente la unión con el anticuerpo. Es bien sabido que los fijadores de entrecruzamiento alteran los resultados de IHC para un número significativo de antígenos, mientras que los fijadores de coagulantes, especialmente el etanol, se ha informado que producen menos cambios, aunque sigue habiendo cierta controversia. En la mayoría de los laboratorios de patología quirúrgica, el fijador utilizado es 10% de formalina tampón neutro (NBF) (un fijador de entrecruzamiento). El procesamiento

posterior generalmente incluye un período en etanol al 100%; por lo tanto, los tejidos se "fijan de manera doble" tanto en formalina como en etanol: si la fijación con formalina es inadecuada, los tejidos se fijarán en parte con alcohol, con la variación "en sección" resultante en la tinción de IHC. Para tejidos fijados en formalina, se sabe que la intensidad de la tinción es dependiente del tiempo de fijación para muchos antígenos.

Una larga historia de uso de formalina como fijador tisular estándar ha revelado las siguientes ventajas; no será reemplazada fácilmente, o pronto:

1. Hay una buena conservación de la morfología, incluso después de una fijación prolongada; en este caso, bueno es un término algo subjetivo que abarca los diversos cambios de artefactos que resultan en el morfológico características que "complacen" al patólogo, en función de su experiencia previa y la forma de procesamiento de la fijación a la que el patólogo se ha acostumbrado.

2. La formalina es una sustancia química económica, mucho más barata que la mayoría de las alternativas.

3. La fijación de formalina esteriliza las muestras de tejido de una manera más confiable que la precipitación de fijadores, particularmente para virus.

4. Los antígenos de carbohidratos están bien conservados.

5. La reticulación de proteínas in situ evita la lixiviación de proteínas que pueden difundirse en el agua o el alcohol. Muchos antígenos (péptidos) de bajo peso molecular se extraen con fijadores que no se entrecruzan, como el alcohol, o las soluciones a base de metanol, pero están bien conservados en el tejido por formalina.<sup>29</sup> Hoy en día, la experiencia muestra que la formalina puede considerarse un fijador satisfactorio tanto para morfología como para IHC, siempre que se disponga de una técnica efectiva de AR para recuperar esos antígenos que están disminuidos o modificados.

Antígeno específico de la próstata

El antígeno prostático específico (PSA) es un miembro de serina proteasa de la familia de las calicreínas glandulares humanas.

El PSA es una glicoproteína de 34 KD de 237 aminoácidos con homología de secuencia alta con glandular humano

Calicreína 2 (HK2). Se sintetiza casi exclusivamente en el epitelio ductal y acinar de la próstata. Se encuentra en el tejido prostático normal, hiperplásico y maligno. El PSA licúa el coágulo de fluido seminal a través de la proteólisis de las proteínas formadoras de gel, liberando así los espermatozoides. Puede alcanzar el suero por difusión desde las células luminales a través de la capa de células basales, la membrana basal glandular y la matriz extracelular. La medición de los niveles séricos totales de PSA es actualmente el pilar de la detección de PCa. Numerosos estudios han demostrado que los pacientes con CaP tienen, en general, niveles elevados de PSA sérico. El punto de corte utilizado más comúnmente para el PSA es de 4 ng / ml. Cuando las concentraciones séricas de PSA son de 4 a 10 ng / ml, la incidencia de detección de cáncer en la biopsia de próstata en hombres con un examen rectal digital (DRE) normal es aproximadamente del 25%. Con los niveles séricos de PSA por encima de 10 ng / ml, la incidencia de cáncer de próstata en la biopsia aumenta aproximadamente al 67%. Sin embargo, el riesgo de cáncer es proporcional al nivel de PSA sérico incluso a valores inferiores a 4 ng / ml. Como han demostrado los grandes ensayos de detección, se producen cánceres clínicamente significativos en hombres con concentraciones séricas de PSA de 2,5 a 4,0 ng / ml; por lo tanto, algunos expertos han propuesto reducir el límite del PSA a 2,5 ng / ml para mejorar la detección temprana del cáncer en hombres más jóvenes. Una vez que el PSA gana acceso a la circulación, la mayoría permanece unida a los inhibidores de la serina proteasa. Los tres inhibidores más reconocibles son  $\alpha$ 1 antiqumotripsina (ACT),  $\alpha$ 2 macroglobulina e inhibidor de la proteína  $\alpha$ 1. El PSA unido a ACT es el más inmunorreactivo y es el que clínicamente es más útil para diagnosticar el cáncer de próstata. Una fracción más pequeña (5% a 40%) del PSA sérico medible es PSA libre (no complejo). El PSA sérico total medido, por lo tanto, refleja tanto libre como complejo

PSA. Se ha demostrado que el porcentaje de PSA libre puede mejorar la especificidad de las pruebas de PSA para el cáncer de próstata. Un porcentaje del valor libre de PSA de menos del 10% es preocupante para el cáncer. Más recientemente, se han descubierto isoformas adicionales de PSA libre, como se detalla en una revisión de Gretzer.<sup>11</sup> El PSA se secreta primero en la forma de

un precursor denominado pro-PSA. Esta forma inactiva de la enzima constituye la mayoría del PSA libre en suero en hombres con cáncer de próstata, lo que hace que el aumento relativo de pro-PSA en suero sea un marcador de riesgo de PCa. BPSA ("PSA benigno") se refiere a una forma escindida de PSA del tejido de BPH. La proporción de proPSA / BPSA se ha propuesto como un medio para mejorar la precisión del diagnóstico de cáncer en hombres con un bajo porcentaje de niveles libres de PSA, que tienen un riesgo relativamente alto de cáncer. Las pruebas de PSA en suero también se pueden utilizar para monitorear a los pacientes después de la terapia para detectar la recurrencia temprana. Después de una prostatectomía radical, el PSA sérico debería caer a niveles indetectables. Los niveles séricos de PSA elevados después de la prostatectomía radical ( $> 0,2$  ng / ml) indican enfermedad recurrente o persistente. Después de la radioterapia para el cáncer de próstata, los valores séricos de PSA disminuirán a un nadir, aunque no en la misma medida que los que siguen a la prostatectomía radical. Tres aumentos subsiguientes en los valores de PSA sérico después de la radioterapia indican fracaso del tratamiento. Aunque la expresión de PSA en tejidos extraprostáticos y tumores distintos de PCA ha sido raramente demostrada (ver Tabla 16.1), para todos los propósitos, la expresión de PSA en el nivel IHC es un marcador específico y sensible de linaje prostático de diferenciación con hasta 97.4% de sensibilidad encontrada en un estudio reciente de nuestro grupo.<sup>13</sup> Las glándulas uretral, periuretral y perianal se encuentran entre los tejidos normales en los que raramente se ha informado que muestran reactividad de PSA. Los neoplasmas extraprostáticos que ocasionalmente expresan PSA incluyen uretra y periuretral adenocarcinoma, carcinoma cloacogénico, adenoma pleomórfico de la glándula salival y carcinoma de conducto salival, así como carcinomas mamarios raros. Aunque un informe raro indicó la expresión de PSA en el adenocarcinoma de vejiga de tipo intestinal, no logramos revelar dicha expresión en un estudio reciente. Estudio de adenoma vellosos y adenocarcinoma de vejiga. Este último es especialmente importante desde el punto de vista del diagnóstico diferencial dada la proximidad topográfica de los dos órganos. Aunque se puede encontrar una intensidad de expresión de PSA más débil en PCa de grado Gleason más

alto, recientemente hemos podido demostrar un alto grado de sensibilidad inmunosanitaria de PSA (97,4%) en carcinoma de próstata de alto grado incluso cuando se utilizó TMA13. Asimismo, la expresión de PSA es valioso para definir un sitio de origen primario prostático durante la evaluación de un carcinoma metastásico poco diferenciado. **(Dabbs, 2006)**

### **Mancha de semen**

En los casos de violación es común contar con muestras de semen secas asentadas sobre diversos soportes, o bien hisopados obtenidos de la víctima. A su vez, este tipo de delitos sexuales, constituyen un grupo de hechos sumamente difíciles de comprobar, de allí, que el procesamiento de los materiales citados adquiera gran importancia ya que con las técnicas actuales podría demostrarse de manera fehaciente la intervención de un determinado individuo.

Se define el esperma como un líquido compuesto por dos fracciones, el líquido seminal y los espermatozoides, revistiendo ambos gran importancia desde el punto de vista pericial.

En el primero encontramos bases orgánicas tales como la colina, la espermina y la espermidina, sustancia este última a la cual debe su olor el esperma. También posee en su composición proteínas entre las cuales se pueden mencionar, por su importancia, la fosfatasa ácida prostática, el antígeno prostático específico (PSA), la fosfoglucomutasa (PGM), peptidasa A (Pep A) y la Glioxilasa I (Glo I). Debe mencionarse también la presencia de sustancias similares a los antígenos del sistema ABO, los cuales estarán presentes en aquellos individuos secretores y que permitirán la determinación del mismo en este fluido. En tal sentido, se conoce que entre el 75 y el 80% de la población tiene esta característica y, por lo tanto, todos sus fluidos corporales contienen este tipo de sustancias.

#### **1. Estudio de las manchas de semen**

Un modo práctico para el estudio de las manchas de semen es el que se detalla en el siguiente cuadro:

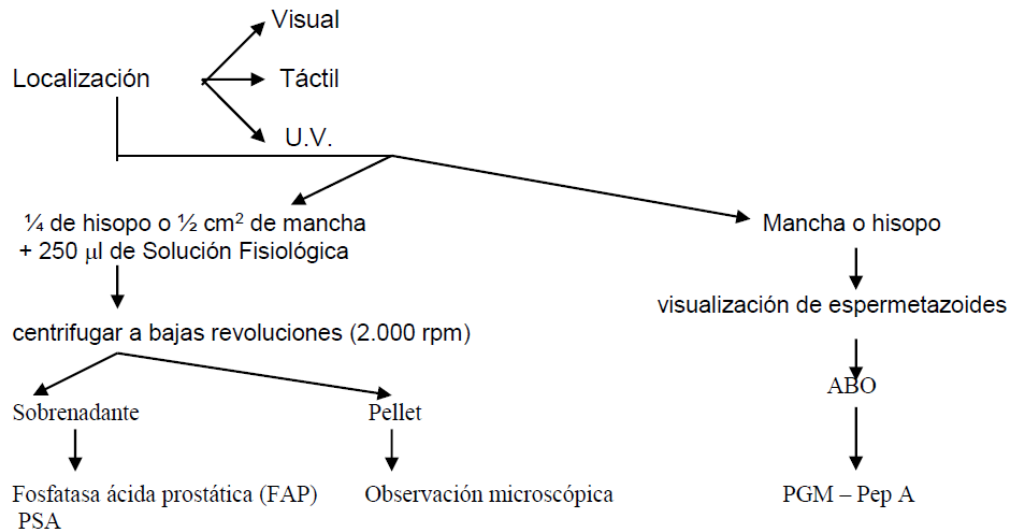


Figura. 1 Secuencia analítica Interpretación de resultados de identificación de semen.

Fuente. Giannuzzi, Ferrari, & Nieto, Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química forense - Mancha de semen, 2006, págs. 195-197

## 2. Localización de la mancha

Las manchas de semen pueden presentarse sobre diversos soportes, pero, los más comunes son la ropa interior de la víctima y las prendas de cama. Un dato a tener en cuenta serán las características del material a examinar, entre las cuales se destaca la capacidad de absorción del mismo, su color, etc.

De todos modos, en general, puede decirse que las manchas de semen presentan un color blanco grisáceo que va tornando hacia el amarillento con el paso del tiempo, adquiriendo, en especial sobre las telas, una consistencia apergaminada, característica que resulta de utilidad para su ubicación por medio del tacto. El empleo de luz U.V. constituía un método práctico para localizar este tipo de manchas, pero los daños que ésta puede causar al material genético ha hecho que caiga en desuso. La misma se basaba en la propiedad fluorescente de las manchas de esta clase.

## 3. Observación de Espermatozoides

La visualización de espermatozoides completos constituye, por sí sola, la única prueba irrefutable de la presencia de semen en una mancha.

De allí que, previo a detallar las técnicas a emplear para tal fin, es importante repasar someramente su estructura. Los espermatozoides son células móviles compuestas básicamente por cabeza (en la cual se encuentra el núcleo), cuello, cuerpo y cola. Su longitud oscila entre 40 y 50  $\mu\text{m}$ , mientras que con respecto a su forma la cabeza, vista de frente, es oval, mientras que de perfil es aguzada.

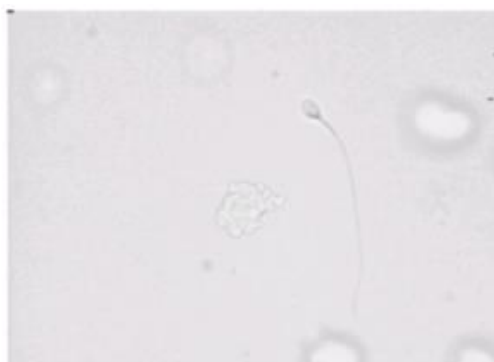


Figura. 2 Foto microscópica de espermatozoide con objetivo 40x método directo, muestra con suero fisiológico.

Fuente. Giannuzzi, Ferrari, & Nieto, Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química forense - Mancha de semen, 2006, págs. 195-197

Para su estudio, tal como puede verse en el esquema precedente, hay dos posibilidades. Una de ellas es trabajar directamente sobre el material motivo de pericia y la otra sobre el pellet obtenido en la centrifugación de un macerado en solución fisiológica de la mancha a estudiar. Cualquiera sea la metodología empleada, un hecho para tener en cuenta es que los espermatozoides son elementos sumamente lábiles, de modo tal que la cabeza y la cola se separan muy fácilmente. De allí que múltiples factores que hacen a la conservación de la muestra dificultan, cuando no imposibilitan, la observación de estos elementos en forma completa. Paralelamente, esto implica un sumo cuidado en el procesamiento del material a estudiar.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que ciertas enfermedades afectan, de forma diversa, la cantidad de espermatozoides que produce un individuo. Así, en la oligozoospermia, su concentración está disminuida, mientras que en la azoospermia no se encuentran presentes en el semen.



Visualización directa: para tal fin, un trocito de la mancha en estudio se coloca en el centro de un portaobjetos, adicionando sobre el mismo una gota de solución fisiológica y otra de una solución al 0,5% de eritrosina en NH<sub>3</sub> al 5% y se comprime el material con ayuda de dos agujas de disección, con el objeto que los componentes de la mancha pasen a la solución. Luego se retira la muestra, se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio con ocular de 40X. Los espermatozoides se verán con la cabeza teñida de color rosa.

Visualización previa centrifugación: en este caso, y tal como se indica en el esquema, se emplea el sedimento de la centrifugación de un macerado de la mancha en solución fisiológica.

Para tal fin,  $\frac{1}{4}$  de un hisopo o un cuadrado de 0,5 cm de lado de tela manchada se colocan en un tubo de centrifuga al cual se adicionan 250  $\mu$ l de solución fisiológica. Luego, con sumo cuidado, se presiona el material contra las paredes del tubo con ayuda de una varilla de vidrio a fin que el material presente en el mismo pase a la solución.

Posteriormente, se retira el material presionando de modo tal que escurra el líquido casi en su totalidad. Luego se centrifuga a baja velocidad (1.500 a 2.000 rpm) durante 3 a 5 minutos. El sobrenadante se transfiere con sumo cuidado a otro tubo y sobre el sedimento se procede a investigar la presencia de espermatozoides, previa resuspensión del mismo agitando suavemente, empleando la coloración descrita precedentemente.

En ese sentido, diversas son las técnicas que pueden utilizarse, siendo una de ellas la desarrollada por I.C. Stone.

Para ello se prepara las siguientes soluciones:

**a)** Solución Kernechtrot; disolver 5g de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (grado analítico) en 100 ml de agua destilada hirviendo. Inmediatamente adicionar 0,1g de Nuclear Fast Red y agitar con ayuda de una varilla de vidrio. Enfriar y filtrar a través de papel de filtro. Esta solución es estable de 3 a 6 meses a 8°C.

**b)** Solución picroindigocarmín (PICS); adicionar 4g de ácido pícrico (grado analítico) a 300 ml de agua destilada, en un vaso de precipitado. Tapar el

recipiente y dejar durante toda la noche a temperatura ambiente a fin de obtener una solución saturada. Luego disolver 1g de Índigo-carmín, filtrar y guardar. Unos pocos cristales de ácido pícrico pueden permanecer en la solución.

Procedimiento: una gota del pellet se coloca en un portaobjetos y se adiciona sobre ésta una gota de solución a), dejando 15 minutos debajo de un vaso de precipitado adecuado (600 ml) invertido. A continuación, con una pipeta limpia adicionar en un lateral del portaobjetos 1 – 2 gotas de agua deionizada de modo tal que no toque la mezcla. Inclinar con cuidado el portaobjetos y quitar el excedente con papel de filtro. No tocar el área original de la gota muestra con el papel. Repetir esta operación hasta que el agua de lavado resulte incolora.

Luego, agregar una gota de la solución b) sobre el sector donde se había colocado la muestra y emplear la misma técnica de lavado descrita anteriormente, pero empleando etanol absoluto. Al observar al microscopio, los espermatozoides se visualizarán teñidos de la siguiente manera: la cabeza de color rojo, la parte central roja y verde y la cola de color verde. De existir células de la mucosa se observarán teñidas de color azul con su centro rojo.

En muestras mal conservadas los espermatozoides pueden aparecer pálidos o descoloridos e, inclusive, de una tonalidad verdosa o violeta. Debe tenerse presente que éste fenómeno también puede ocurrir en casos de sobre coloración con la solución b).

Si los espermatozoides no se observan completos, el autor refiere que pueden reconocerse las colas, aunque debe recordarse aquí la importancia, por el grado de certeza, de observar estos elementos completos. Una variante más sencilla de realizar esta técnica es la siguiente: una gota del sedimento se fija a un portaobjetos mediante la acción del calor (30 minutos a 60°C).

Luego, cubrir el preparado con una gota de Nuclear Fast Red y dejar al menos 10 minutos. Lavar con agua destilada. A continuación, adicionar una gota de picroindigocarmín y rotar el preparado durante 15 – 30 segundos (pero no más). Lavar con etanol, secar y observar a 400X, usando aceite de inmersión de ser necesario.

Otras metodologías a emplear serían Papanicolau, May Grünwald – Giemsa, azul de Loeffler, etc. Cualesquiera fuera la metodología empleada, se

coloca una gota del sedimento en un portaobjetos, se hace un extendido y se lo deja secar al aire, pudiendo recurrir eventualmente y con precaución, a una fijación con ayuda de calor muy suave. (Giannuzzi, Ferrari, & Nieto, Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química forense - Mancha de semen, 2006, págs. 195-197)

Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos: La morfología del espermatozoide, según numerosos estudios, es uno de los factores más importante en la obtención de fecundación tanto en IIU como en FIV-ICSI.

La OMS ha descrito distintos criterios de clasificación para los espermatozoides que son cada vez más restrictivos. La OMS de 1992 considera como normales aquellas muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides normales superior al 30%.

Sin embargo, la OMS de 1999 y 2010 impusieron unos valores de referencia más restrictivos, y consideran muestras normales aquellas que presentan unos porcentajes superiores al 14 y al 4 % respectivamente, siguiendo los criterios estrictos de Kruger.

Diversas publicaciones han relacionado la morfología espermática con otras características seminales como la concentración, motilidad y calidad de la misma, por lo que las alteraciones morfológicas de los espermatozoides podrían estar relacionadas con las alteraciones de otras variables de la muestra en fresco. El objetivo del presente trabajo es relacionar la morfología de los espermatozoides con distintos parámetros seminales en fresco, tanto macroscópicos como microscópicos, en varones normales y oligoastenoteratozoospermicos, en función de los criterios descritos por la OMS de 2010. Se analizaron un total de 99 muestras de sémenes diagnósticos, de las cuales 54 se correspondieron con varones normales y 45 con varones oligoastenozoospermicos.

El 23,23% de las muestras fueron teratozoospermicas. De cada una de las muestras se estudiaron las variables relacionadas con la calidad del semen, como volumen, licuado, pH, concentración y motilidad. La morfología se analizó mediante el analizador automático de espermatozoides (CASA). Los resultados

obtenidos demuestran que la morfología espermática está relacionada con la motilidad de la muestra en fresco, ya que los espermatozoides morfológicamente normales presentan una motilidad superior, mientras que la concentración espermática no parece estar relacionada con dicha morfología.

### **Análisis de la muestra de semen**

El análisis rutinario de las muestras de semen incluye dos tipos de examen, el macroscópico y el microscópico según la OMS de 1999 y 2010:

Análisis macroscópico: incluye aquellas variables que se pueden valorar a simple vista. No debe realizarse más de una hora después de la eyaculación para evitar la deshidratación y/o cambios en la temperatura que alteren la calidad del semen.

### **Volumen**

El volumen del eyaculado se mide por aspiración completa de la muestra empleando una pipeta graduada de 10 ml. Según los valores de referencia de la OMS de 1999, se considera una muestra normal a aquella que tiene un volumen igual o superior a 2 ml. Un volumen inferior puede ser indicativo de obstrucción de las vías seminales o ausencia de conductos deferentes, pérdida de alguna fracción de la muestra en el momento de la recogida o eyaculación retrógrada. Un volumen elevado puede deberse a un aumento del volumen de secreción de algunas glándulas, como ocurre en caso de inflamación o en periodos largos de abstinencia.

### **Viscosidad**

La viscosidad o consistencia de la muestra licuada se estima aspirando la muestra con una pipeta y observando la libre caída de las gotas para ver la longitud del filamento formado. En una muestra normal se observan gotas pequeñas y bien definidas, mientras que en las muestras de viscosidad anómala se observa la formación de un filamento. Según el grado de viscosidad las muestras se clasifican según aparece en la tabla 2:

**Tabla 2.**  
Clasificación de la viscosidad y símbolo asociado

Simbología	Significado
+	la muestra es demasiado viscosa y no entra en la pipeta
++	forma un hilo al caer
+++	el eyaculado cae gota a gota

*Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.*

Una viscosidad elevada, resultado de una inflamación crónica de próstata, alto contenido de moco o presencia de anticuerpos antiespermatozoides entre otras causas, interfiere con todas las determinaciones posteriores, como motilidad o concentración.

### **Licuefacción**

La licuefacción es el paso del estado de gel del eyaculado, en el cual los espermatozoides se encuentran atrapados entre las fibras del coágulo mucoso y en letargo, a un medio líquido por la acción de los activadores del plasminógeno. La licuefacción se analiza mediante una simple observación visual. Ocurre normalmente en los primeros 15 minutos tras recoger la muestra, a temperatura ambiente, y se considera anormal cuando no tiene lugar pasados 60 minutos de la recogida. Cuando la licuefacción no es completa debe anotarse en el informe del seminograma.

### **pH**

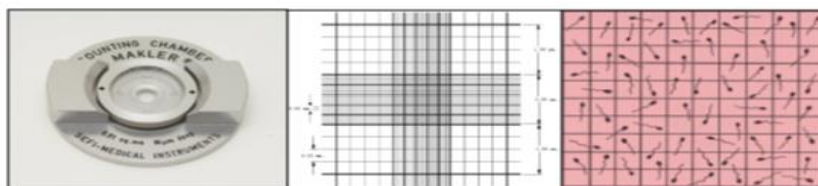
El pH refleja el balance entre las diferentes secreciones, ya que el pH de la próstata es ácido y el de las vesículas seminales es alcalino. Se mide con tiras de papel con un intervalo de 6,5 a 10. Para medirlo se coloca una gota de semen sobre la tira y a los 30-60 segundos la zona impregnada, que debe ser uniforme, se compara con la cartilla de calibración para determinar el pH de la muestra, que debe ser igual o superior a 7,2. El pH del semen se alcaliniza, por lo que es conveniente medirlo después de la licuefacción. Un pH inferior a 6,5 o 7 puede ser indicativo de una obstrucción de las vías eyaculatorias, ausencia bilateral

congénita de los vasos deferentes o anomalía funcional de las vesículas seminales.

Examen microscópico: para su realización es imprescindible la utilización de un microscopio de contraste de fases.

### **Concentración o recuento de espermatozoides**

Para determinar la concentración espermática se emplea la cámara Makler (Sefi Meical Instruments, Haifa, Israel), que está compuesta de dos piezas de cristal ópticamente planas. La parte superior, que sirve de cubreobjetos, está subdividida en 100 microcuadrados de 0,1 x 0,1 mm de lado. La profundidad de la cámara es de 10 micras (Figura 3). En primer lugar, se calienta la cámara a 37°C para evitar el shock térmico, y a continuación se coloca una gota de 5 a 10 µl de semen y se observa al microscopio a un aumento de 200x. De esta manera, el número de espermatozoides contenidos en cualquier línea de 10 microcuadrados indicará la concentración en millones/ml, ya que la cámara permite que los espermatozoides sean distribuidos de manera uniforme.



*Figura. 3.* Imagen de un contador cámara de Makler y esquematización de las medidas de la cuadrícula y visualización en 200 aumentos.

Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.

### **Motilidad**

La motilidad espermática se valora también empleando la misma cámara Makler. La OMS categoriza la motilidad en cuatro grupos (Figura 4). Los espermatozoides con motilidad rápida progresiva son aquellos que avanzan de forma rectilínea con una velocidad superior a 25 µm/s. Por debajo de éstos se encuentran los que presentan un movimiento progresivo lento, en la que los espermatozoides se desplazan, pero sin experimentar un avance efectivo, es decir, formando elipses. Y por último se encuentran los que presentan una motilidad no progresiva, y sólo mueven la cabeza y/o cola sin desplazarse, y los inmóviles.

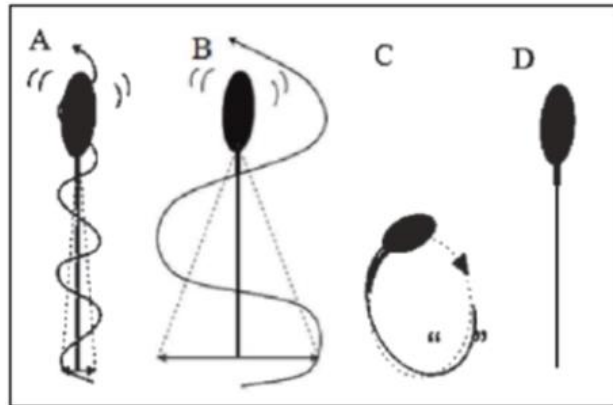


Figura. 4. Tipo de movilidad de los espermatozoides. A. Progresivo rápido. B. Progresivo lento. C. No progresivo. D inmóvil.

Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical

**Tabla 3.**

Cada una de estas categorías recibe una nomenclatura distinta.

Categoría OMS	Denominación	Velocidad
Rápida progresiva	a / +++	$\geq 25 \mu\text{m/s}$
Progresiva lenta	b / ++	5-24 $\mu\text{m/s}$
No progresiva	c / +	$< 5 \mu\text{m/s}$
Inmóviles	d / 0	-

Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.

La motilidad se valora observando 100 espermatozoides y estimando el porcentaje de ellos que presenta cada una de las categorías. Para ello es aconsejable valorar grupos de 10 espermatozoides y después obtener un valor promedio.

### **Aglutinación**

Las aglutinaciones se producen cuando los espermatozoides se adhieren entre sí a través de la cabeza, la pieza intermedia o la cola. La presencia de aglutinaciones es indicativa de que puede existir una esterilidad de causa inmunológica. En ocasiones puede aparecer una pseudoaglutinación, que es la adhesión de los espermatozoides con filamentos de moco, con otros tipos

celulares que no son espermatozoides o con detritos, que no se considera aglutinación. Para la valoración se emplea la siguiente simbología (Tabla 4):

**Tabla 4.**

Clasificación de la aglutinación en distintos grados y símbolo de cada uno.

Símbolo	Significado
+	Pequeñas aglutinaciones que implican a menos del 20% de los espermatozoides
++	La aglutinación implica a un 20 - 60 % de los espermatozoides
+++	Más del 60% de los espermatozoides están aglutinados

*Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.*

### **Morfología espermática**

La morfología se analiza con el objetivo de 100 aumentos bajo aceite de inmersión. La clasificación morfológica seguida es la de la OMS de 1992 y la descrita por Kruger, Acosta y colaboradores, incluidas en las recomendaciones de la OMS de 1999. Las categorías en las que se clasifican son las siguientes, atendiendo a la morfología de la cabeza, cuello y pieza intermedia, cola y gota citoplasmática:

**Espermatozoide normal:** La OMS considera espermatozoides morfológicamente normales a aquellos integrantes de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical. Se caracterizan por poseer una cabeza ovalada y aplanada anteriormente, de 3,7 a 4,7  $\mu\text{m}$  de longitud y 2,5 a 3,2  $\mu\text{m}$  de anchura. El acrosoma debe ser aproximadamente de un tamaño de entre el 40 al 70% de la cabeza. La pieza intermedia debe ser menor a 1  $\mu\text{m}$  de anchura y la longitud aproximadamente la mitad de la longitud de la cabeza. La cola o flagelo debe ser uniforme y ligeramente más delgada que la pieza intermedia, desenrollada (recta o sin presentar angulaciones bruscas que sugieran rotura) y de una longitud de 45  $\mu\text{m}$ . La gota citoplasmática debe ser inferior a la tercera parte de la cabeza. Las bolsas citoplasmáticas a la altura de la pieza intermedia no deben ser mayores que la mitad del espermatozoide. La ausencia o presencia de una



pequeña vacuola en la cabeza se considera normal, pero si aparecen muchas o son excesivamente grandes puede significar que el ADN está dañado.

Espermatozoide casi normal: Poseen una anchura de 2 a 3,5  $\mu\text{m}$ , pueden presentar anomalías ligeras en la forma de la cabeza, pero el acrosoma debe ser normal, y no tener defecto en el cuello, pieza intermedia o cola.

Espermatozoides anormales: Son aquellos que presentan defectos tanto en la cabeza, cuello, pieza intermedia y cola.

Defectos en la cabeza: presentan cabezas grandes, de más de 6  $\mu\text{m}$  de longitud y/o más de 3,5  $\mu\text{m}$  de anchura, formas redondas, alargadas, pequeñas, con forma de pera, irregulares, con ausencia de acrosoma, con acrosoma inferior al 30% del tamaño de la cabeza o superior al 70% o con vacuolas de más del 20% del área de la cabeza.

Defectos del cuello y cola: presentan colas o piezas intermedias quebradas, es decir, formando un ángulo de  $90^\circ$  o más con el eje longitudinal de la cabeza, colas cortas o ausencia de cola.

Defectos en la pieza intermedia: pieza intermedia anormalmente estrecha, con forma irregular, o con bolsas citoplasmáticas de un tamaño superior a la tercera parte del área de la cabeza.

Formas dobles: presentan cabeza y/o colas dobles.

Colas enrolladas, cortas, dobladas, irregulares o múltiples. En las figuras 5 y 6 se observan los tipos de anomalías morfológicas más comunes que suelen aparecer en los espermatozoides.

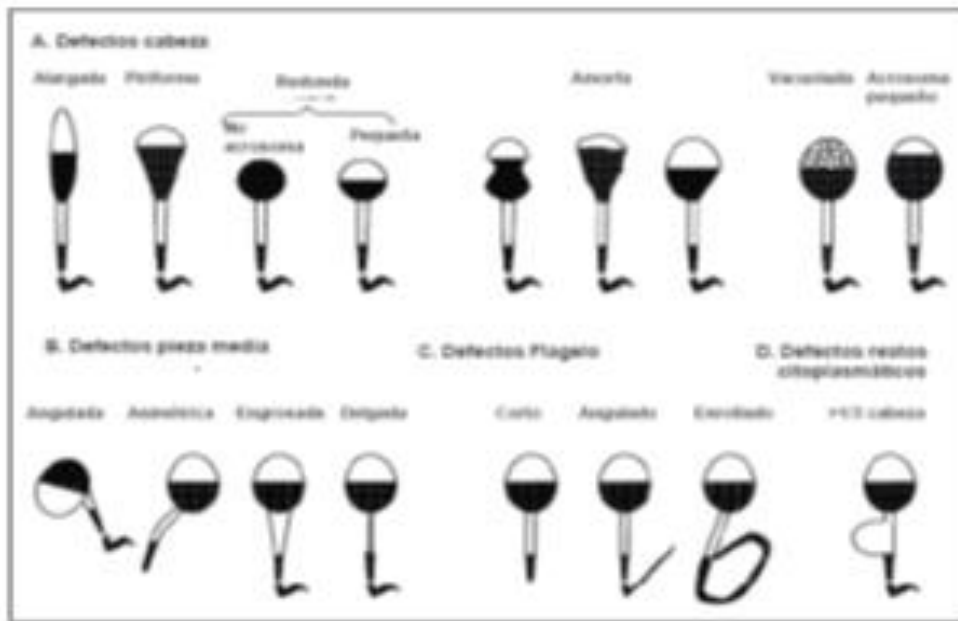


Figura. 5. Clasificación de los defectos morfológicos de los espermatozoides.  
 Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.

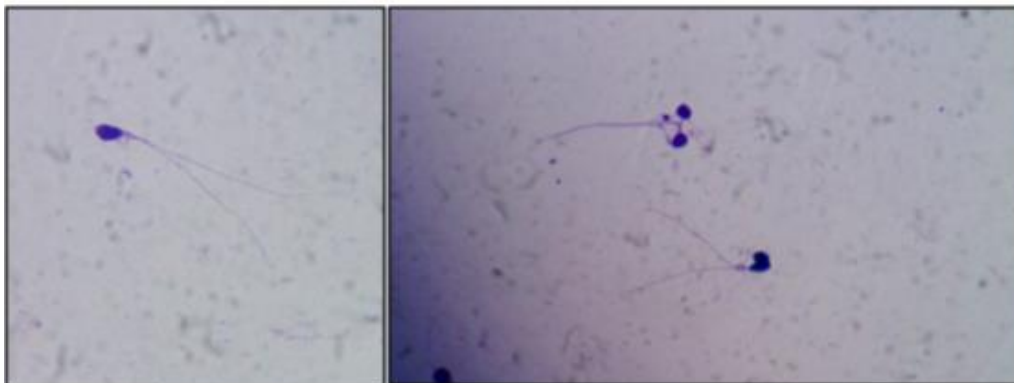


Figura.6. Espermatozoides morfológicamente anormales con colas dobles y cabezas dobles. Tinción de la muestra de semen (método Diff-Quik).  
 Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.

La OMS de 1992 considera los espermatozoides casi normales como normales, y define como eyaculados de buen pronóstico aquellos que presentan un porcentaje superior al 30% de formas normales. Sin embargo, la OMS de 1999 establece tres categorías de fertilidad aplicando los criterios estrictos de Kruger, que son varón fértil cuando tiene un porcentaje de espermatozoides normales superior al 14%, varón de buen pronóstico a aquel que presenta entre

un 4 y un 14 % de formas normales, y varón de mal pronóstico al que tiene menos de un 4% de espermatozoides normales.

Por último, el quinto manual de la OMS establece un valor para el límite inferior de referencia para la morfología espermática del 4%. Tomando como referencia los valores de la OMS de 2010, las muestras se clasifican en función del recuento, motilidad y morfología en las siguientes categorías:

**Normozoospermica:** eyaculado normal, con  $\geq 15$  millones de espermatozoides/ml, una motilidad  $\geq 32\%$  (tipo a+b) y con una morfología  $\geq 4\%$  de formas normales.

**Oligozoospermica:** presenta una baja concentración espermática, inferior a 15 millones espermatozoides/ml.

**Astenozoospermica:** presentan una motilidad baja, inferior a un 32% de tipo a+b.

**Teratozoospermica:** presenta una morfología anormal,  $< 4\%$  de formas normales.

**Oligoastenozoospermica:** tanto la concentración como la motilidad son bajas, y se distinguen dos tipos:

**Moderada (OAM):** concentración entre 10 y 15 millones de espermatozoides/ml y motilidad entre 20 y 32% de tipo a+b.

**Severa (OAS):** concentración inferior a 10 millones/ml, y motilidad por debajo de 20% de a+b.

**Oligoastenoteratozoospermica:** todas las variables están alteradas.

**Azoospermica:** no presenta espermatozoides en el eyaculado.

Aspermia: ausencia de eyaculado.

Los valores de referencia según la OMS de 2010 para las variables seminales se resumen en la tabla 5.

Tabla 5.

*Valores de referencia de cada una de las distintas variables seminales*

Variable seminal	Valor de referencia
Volumen	1,5 (1,4 - 1,7)
pH	≥ 7,2
Concentración de espermatozoides (10 <sup>6</sup> por eyaculado)	15 (12-16)
Número total de espermatozoides (10 <sup>6</sup> por eyaculado)	39 (33-46)
Motilidad (tipo a + b)	32 (31-34)
Morfología espermática	≥ 4

*Fuente: Manual de laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de La interacción entre el semen y el moco cervical.*

### **Tinción de la muestra de semen (método Diff-Quik)**

La determinación de la morfología espermática consta de varios pasos. En primer lugar se realiza una extensión de una gota de semen de 10 a 15 µl en un portaobjetos. Para ello se coloca otra porta formando un ángulo de 45 °, tal y como se muestra en la figura 6, y tocando la gota se arrastra y se deja secar al aire.

Una vez seca, se procede a la fijación con etanol absoluto (99,8%), y posteriormente a la tinción de la muestra mediante el método Diff-Quik. Este es un método de tinción rápido y fácil de usar, que consta de dos pasos. Primero se introduce la porta en la solución de tinción 1 (PANREAC: eosina amarillenta para tinción rápida, n° Cat. 253999), durante 30 segundos, y después otros 30 segundos en la solución de tinción 2, que es el colorante Giemsa (MERK: azul-eosina azul de metileno, en metanol, n° Cat. 1092040500). Luego se lava con agua destilada para eliminar los restos del colorante y se deja secar al aire. Después se coloca un cubreobjetos sobre la porta aplicando, mediante una pipeta Pasteur, unas gotas de pegamento Eukitt (Eukitt® lot. N° G47 500 ml) para que las muestras puedan ser almacenadas durante largos períodos de tiempo sin sufrir ningún tipo de daño. **(Gimeno, 2016, págs. 11-20)**

## **SEMIOLOGÍA (ES EL ESTUDIO DEL SEMEN)**

La semiología es el estudio de los Fluidos Seminales o Semen el cual se lo puede encontrar en la escena del crimen o en el cuerpo de la víctima, tiene un vínculo directo con los crímenes de agresión sexual y será de vital importancia al momento de realizar los estudios correspondientes para su identificación y cotejo con el autor o autores. El Semen es la sustancia que segregan los órganos reproductores masculinos y en la cual se encuentran los espermatozoides.

**Antígeno Prostático Específico:** El antígeno prostático específico (frecuentemente abreviado por sus siglas en inglés, PSA) es una sustancia proteica sintetizada por células de la próstata y su función es la disolución del coágulo seminal. Es una proteína de síntesis exclusiva en la próstata. Una pequeñísima parte de este PSA pasa a la circulación sanguínea de hombres enfermos, y es precisamente este PSA que pasa a la sangre, el que se mide para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer -tanto localizado como metastásico y otros trastornos de la próstata, como la prostatitis.

Los niveles normales en sangre de PSA en los varones sanos son muy bajos, del orden de millones de veces menos que el semen, y se elevan en la enfermedad prostática. Los valores de referencia para el PSA sérico varían según los distintos laboratorios, aunque normalmente éstos se sitúan en 4 ng/mL. Su producción depende de la presencia de andrógenos y del tamaño de la glándula prostática. Fosfatasa Ácida: AcP Es secretada por las células de la próstata, en grandes cantidades desde la adolescencia hasta los 40 años. El hallazgo del mismo es un Test de Presunción de la presencia de semen (Prieto V. 2008 pg. 4122).

### **Transporte y cuidado de las manchas como evidencia.-**

Dado que los estudios de semen se realizan principalmente en base a la presencia de espermatozoides, es de suma importancia el proteger las prendas que contengan a los mismos. Muchos expertos consideran que la presencia de un espermatozoide completo es la única prueba irrefutable de la presencia de semen. Por esta razón, las prendas de vestir deberán manejarse con mucho

cuidado, no deberá doblarse ni enrollarse la parte manchada y definitivamente no deberá someterse a fricción.

NOTA: En caso que el individuo NO PRODUZCA ESPERMATOZOIDES por una alteración metabólica de su organismo, se denomina a este tipo de alteración clínica.

### **NOMENCLATURA DESCRIPTIVA DE LOS HALLAZGOS DEL ESPERMOGRAMA. -**

- **Normozoospermia:** Concentración de espermatozoides de 20 000 000/mL. - **Oligozoospermia:** Concentración de espermatozoides # 20 000 000/mL. - **Astenozoospermia:** Menos del 50 % de espermatozoides con progresión lineal (movilidad a+b) o menos del 25 % con progresión rápida (movilidad a). - **Teratozoospermia:** Menos del 50 % de espermatozoides con morfología normal. - **Azoospermia:** Ausencia de espermatozoides en el eyaculado. - **Aspermia:** Ausencia de eyaculado externo. - **Leucocitospermia:** Presencia de 1 000 000, de leucocitos/mL. La interpretación de las características de las distintas cualidades del semen que ofreceremos se basa fundamentalmente en nuestra experiencia, aunque también nos apoyamos en las recomendaciones de la OMS y en las experiencias de otros autores de reconocido prestigio.

La azoospermia se define como la ausencia de espermatozoides en el semen e indica un daño severo del epitelio germinal (azoospermia secretora), cuyas causas más comunes son la aplasia germinal o síndrome de sólo células de Sertoli y la detención de la maduración espermática o arresto de la espermatogénesis, también puede deberse a una obstrucción total de las vías seminales (azoospermia obstructiva);<sup>1-7,9</sup> el hallazgo de azoospermia en una muestra de semen, ya sea secretora u obstructiva, es siempre de muy mal pronóstico (Padrón Durán,2005. pg.2654) En estos dos casos donde no encontraremos la presencia de espermatozoides como en el uso del condón como en individuos que no producen espermatozoides, en las víctimas de agresión sexual, deberemos tomar en cuenta en los otros componentes del semen, como lo que es la PSA, líquido seminal.

## **DONDE PUEDE ENCONTRARSE EL SEMEN. -**

En la búsqueda de semen en la escena del crimen, debe dársele mayor importancia a la ropa interior de la víctima y del sospechoso, sabanas, toallas, papel higiénico, clínex, pisos, alfombras, asiento de auto etc. El semen antes de secarse, posee un olor alcalino característico, y contiene millones de espermatozoides. Al secarse, la mancha pierde su olor, los espermatozoides mueren, adquiere un color blanco grisáceo, y a veces amarillento, e impregnado a las telas aparenta un aspecto almidonado.

## **ESTUDIOS QUE SE REALIZAN EN EL SEMEN**

Existen una serie de análisis por los cuales los laboratorios forenses llegan a determinar la presencia de espermatozoides. Los estudios del semen en el laboratorio obedecen a dos tipos de métodos:

## **METODOS DE ORIENTACION**

### **1. Determinación de la presencia de espermatozoides**

Una vez recogido el semen, debe permanecer durante varios minutos en la cámara a 37 °C. La detección de espermatozoides en la investigación microscópica es generalmente aceptada como la evidencia más sensitiva y específica para la detección de semen. (Prof. Dr. Dennis A. Castro Bobadilla Facultad de Medicina, UNAH Investigación de Delitos Sexuales Detección de Semen en la Piel. Decastro@honutel.com).

El componente seminal que puede detectarse a más largo plazo son los espermatozoides. Se puede aceptar, en personas vivas y de forma general un período máximo de 7 días para detectar cabezas de espermatozoides en vagina, dos o tres días en ano o recto y 24 horas en boca. Es normal observar espermatozoides intactos (con cola) en vagina dentro de las 24 horas siguientes al acto sexual, pero rara vez se encuentran en boca, ano o recto tras las 5 horas de los hechos. En cuanto a la actividad AcP, puede detectarse en vagina hasta las 72 horas postcoital, mientras que la PSA decae drásticamente a partir de las 24 horas. Todos estos datos están afectados de una cantidad tal de variables sin

controlar, que es imposible utilizarlos para estimar un intervalo desde la agresión hasta la toma de muestras, quedando la cuestión de la data sin resolver hasta el momento **(Prieto V.; 2008.Pg. 4124)**

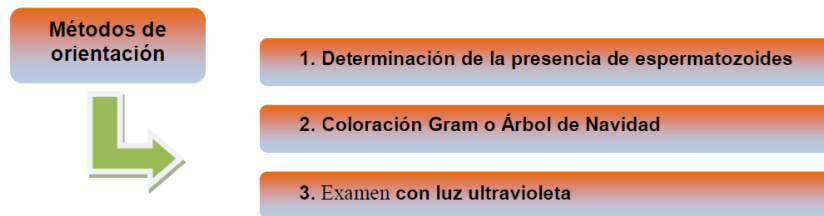


Figura. 7 Métodos de Orientación

Fuente: *Propuesta de la aplicación de un manual de procedimientos para la colección de indicios biológicos en el lugar del hecho y en el cadáver, para los funcionarios policiales de la división de laboratorio técnico científico de la FELCC zona central la paz. Terán M. 2011*

### **Coloración Gram o Árbol de Navidad**

Las muestras son extraídas de los diferentes soportes, y posteriormente coloreadas, la coloración de contraste se denomina Árbol de Navidad, bajo la coloración Gram los espermatozoides aparecen con los contornos parecidos a un árbol de navidad de allí su nombre. **(Salcedo Mercedes 2007 pág. 68.)**

### **Examen con luz ultravioleta**

Los métodos físicos consisten en la exposición de la mancha a la radiación ultravioleta, la cual inducirá una fluorescencia característica con una intensidad máxima de cerca de 4200 mu. De todas formas, el gran problema que presenta la fluorescencia es que no es específica del semen, sino que producirá la misma reacción con otros fluidos biológicos.

## **METODOS DE CONFIRMACIÓN**

**1. Métodos Cristalográficos:** La Reacción de Florence El método se basa en la formación de cristales de yoduro de colina. Debemos recordar que, la colina no es exclusiva del semen, pero resultará de gran importancia en el análisis de muestras de esperma aspermias, principalmente porque no se conocen otros fluidos que registren simultáneamente una alta presencia de colina junto con fosfatasa ácida como en el esperma.



**2. Métodos Microscópicos:** El hallazgo de un espermatozoide completo es la prueba innegable de semen como parte constitutiva de la mancha. Si la mancha se encuentra todavía húmeda, o por lo menos es de reciente data, por lo general esta determinación no será muy compleja, pero puede complicarse con el paso sucesivo del tiempo, la contaminación adquirida y la superficie en la que se encuentra la muestra. Para los casos en los que hay contaminación sanguínea, se recomienda utilizar una solución de saponina en el preparado, la cual separa los glóbulos rojos. Un dato importante es la supervivencia que presentan los espermatozoides en fluido vaginal, en el que fueron encontrados inmóviles hasta 100 días después de ser eyaculados independientemente del clima.

**3. Métodos Cromatográficos:** Los métodos de cromatografía en capa delgada son utilizados principalmente cuando no es posible visualizar un espermatozoide completo. En este caso se tomará que la no cristalización será negativa el estudio y por el contrario si sucede la cristalización nos orientará que la mancha se trata de espermatozoides.

**4. Métodos Electroforéticos** Este es un método conformado por dos técnicas que se realiza sobre papel combinando métodos electroforéticos (luz ultravioleta) y con cromatográficos (cristalización), ambos permiten la separación de la espermina de los aminoácidos del semen.

**5. Métodos Enzimáticos sobre la Fosfatasa Ácida:** Fosfatasa ácida es cualquier enzima capaz de hidrolizar un fosfato orgánico en medio ácido. La proporción de esta enzima encontrada en el esperma no es comparable con la encontrada en ningún otro fluido biológico.

La fosfatasa ácida es una sustancia que se encuentra en mayor cantidad en el semen. ( **Terán, 2011**).

Tabla 6

Interpretación de resultados de Fosfatasa alcalina para identificación de semen

ESPERMATOZOIDES	FOSFATASA ACIDA	INTERPRETACION
Se observaron	Se detecto	Es semen
Se observaron	No se detecto	Es semen
No se observaron	Se detecto	Es semen
No se observaron	No se detecto	Es semen
No se observaron	No se detecto	No es semen
No se observaron	Se detecto	No es semen

Fuente: Formación criminalística enfoque pericial algunos aspectos de la investigación científica forense. Estévez, 2008.

Tabla 7.

Normas de petición para la determinación de semen y su envío en laboratorios forenses de biología.

<p><b>NOMBRE DEL ANALISIS</b> Determinación de semen y cuantificación de espermatozoides mediante las técnicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Antígeno Prostático Específico (PSA)</li> <li>✓ Coloración Hematoxilina-Eosina.</li> </ul>
<p><b>MUESTRAS PARA ENVIAR</b></p> <p><b>Hisopeados:</b> Muestras colectadas de la cavidad vaginal, rectal y oral .Se debe enviar como mínimo 3 hisopos por muestra colectada, estos deberán estar <b>secos</b> antes de embalarlos ya sea en sobres de papel nuevo o en tubos de ensayo de vidrio estériles y con cierre hermético. <b>NOTA:</b> El secado debe realizarse por lo menos 3 MINUTOS en un lugar donde no exista riesgo de contaminación, humedad, ni exposición directa al sol.</p> <p><b>Prendas:</b> Las prendas íntimas tanto de la víctima como del agresor (como alguna otra prenda que presente manchas y rastros de líquidos biológicos), deberán ser enviadas al laboratorio, haciendo la colección con guantes, embaladas por separado en sobres de papel, rotuladas de forma correcta.</p>
<p><b>OBJETO DEL ESTUDIO</b> El hallazgo de espermatozoides o de líquidos seminales componentes del semen, en delitos de agresión sexual.</p>
<p><b>LEGALIDAD</b> Se enviarán las muestras en cumplimiento de requerimiento fiscal, junto al acta de colección de evidencias realizando la cadena de custodia</p>

Fuente: Propuesta de la aplicación de un manual de procedimientos para la colección de indicios biológicos en el lugar del hecho y en el cadáver, para los funcionarios policiales de la división de laboratorio técnico científico de la FELCC zona central la paz. Terán M. 2011

Tabla 8.

Procesamiento de las diferentes presentaciones en la que podemos encontrar el semen como indicio biológico.

Tipos de muestra	Condición	Localización	Procedimiento	Embalaje
Semen	Mancha o salpicaduras	Armas de fuego	Envía el arma	Coloque cada elemento en un contenedor como bolsas de papel o cajas de cartón, separado y rotulado. NUNCA utilizar bolsas plásticas. Conserve a +4 grados o almacene congelado.
		Objetos pequeños	Envíe el objeto	
	Vehículos, tapetes, alfombras, papel de colgadura, madera	Corte de mancha, empaque individualmente y colecte un blanco control o transfiera a hisopos estériles previamente humedecido con agua destilada y deje secar. Colecte también un blanco control.		
	Líquido	Paredes, pisos y en general superficies no removibles.	Transferir a hisopos estériles previamente humedecidos con agua destilada y deje secar. Colecte también un blanco control.	
		Víctima	Conduzca la víctima al Instituto de Investigaciones Forenses, o a un centro de atención médica (realizar la colección de muestras con requerimiento fiscal).	
	Costra	Escena	Transferir a hisopos estériles previamente humedecidos con agua destilada y deje secar. Colecte también un blanco control.	
Macha seca	Prendas	Deje secar y empaque individualmente.		
	Prendas	Igual al ítem anterior		
		Tapetes, alfombras	Corte de mancha, empaque individualmente y colecte un blanco control.	

Fuente: Propuesta de la aplicación de un manual de procedimientos para la colección de indicios biológicos en el lugar del hecho y en el cadáver, para los funcionarios policiales de la división de laboratorio técnico científico de la FELCC zona central la paz. Terán M. 2011

## Histoquímica y citoquímica

Los procedimientos químicos específicos pueden proveer información acerca de la función de las células y de los componentes extracelulares de los tejidos.

Los procedimientos histoquímicos y Citoquímicos pueden tener su fundamento en la unión específica de un colorante, en el uso de anticuerpos marcados con un colorante fluorescente con un componente celular en particular o en la actividad enzimática inherente de un elemento constitutivo de la célula.

Además, muchas macromoléculas presentes en las células pueden detectarse mediante la autorradiografía, en la cual precursores moleculares marcados radiactivamente se incorporan en las células y en los tejidos antes de la fijación. Muchos de estos procedimientos pueden utilizarse en preparados tanto para la microscopia óptica como para la microscopia electrónica.

Antes de comentar sobre la química de las tinciones de rutina y de las técnicas histoquímicas y citoquímicas, es conveniente describir brevemente la índole de un corte histológico de rutina.

### Composición química de las muestras histológicas

La composición química de un tejido listo para una tinción de rutina difiere de la del tejido vivo.

Los componentes que perduran después de la fijación son principalmente moléculas grandes que no se disuelven con facilidad, en especial después de aplicar el fijador. Estas moléculas, en particular las que reaccionan con otras moléculas semejantes para formar complejos macromoleculares, son las que suelen conservarse en un corte histológico. Los siguientes son ejemplos de complejos macromoleculares grandes:

- Nucleoproteínas, formadas a partir de ácidos nucleicos unidos a proteínas;
- Proteínas intracelulares del citoesqueleto, en complejo con proteínas asociadas;

- Proteínas extracelulares en grandes aglomeraciones insolubles, unidas a moléculas similares mediante enlaces cruzados de moléculas vecinas, como ocurre en la formación de las fibras de colágeno;

- Complejos de fosfolípidos y proteínas (o hidratos de carbono) en las membranas.

Estas moléculas constituyen la estructura de las células y los tejidos; es decir, son los elementos morfógenos hísticos. Son la base de la organización del tejido que se observa con el microscopio.

En muchos casos, un elemento estructural es al mismo tiempo una unidad funcional. Por ejemplo, en el caso de las proteínas que forman los filamentos contráctiles de las células musculares, ellos son los componentes estructurales visibles y además participan en el proceso de contracción. El ARN del citoplasma aparece como parte de un componente estructural (p. ej., el ergastoplasma de las células secretoras, sustancia de Nissl de las neuronas) y es también el participante activo en las síntesis de proteínas.

Muchos de los componentes de los tejidos se pierden durante la preparación de rutina de los cortes teñidos con H&E.

A pesar de que los ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos en su mayoría se conservan en los cortes de tejidos, también muchos se pierden. Las proteínas pequeñas y los ácidos nucleicos pequeños, como los ARN de transferencia, en general se pierden durante la preparación del tejido. Como se mencionó antes, los lípidos neutros suelen disolverse mediante el uso de solventes orgánicos utilizados en la preparación de tejidos. También pueden perderse otras moléculas grandes, por ejemplo, al ser hidrolizadas como consecuencia del pH desfavorable de las soluciones fijadoras. Algunos ejemplos de moléculas que se pierden durante la fijación de rutina en fijadores acuosos son:

- Glucógeno (hidrato de carbono intracelular común en el hígado y las células musculares)

- Proteoglicanos y glucosaminoglucanos (hidratos de carbono complejos extracelulares que se encuentran en el tejido conjuntivo).

Sin embargo, estas moléculas pueden conservarse utilizando fijadores no acuosos para el glucógeno o añadiendo agentes ligadores especiales a la solución fijadora que preserven las moléculas extracelulares que contienen hidratos de carbono.

### **Grupos aldehído y el reactivo de Schiff**

La capacidad de la fucsina básica decolorada (reactivo de Schiff) para reaccionar con los grupos aldehído trae como resultado la aparición de un color rojo distintivo y es la base de las reacciones de ácido peryódico-reactivo de Schiff y de Feulgen.

La reacción de ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) tiñe hidratos de carbono y macromoléculas con abundancia de ellos. Se utiliza para demostrar glucógeno en las células, moco en diversas células y tejidos, la membrana basal subyacente epitelios y fibras reticulares en el tejido conjuntivo. El reactivo de Schiff también se utiliza en la reacción de Feulgen, que se basa en una hidrólisis débil con ácido clorhídrico para teñir el ADN.

La reacción de PAS tiene como fundamento lo siguiente:

- Los anillos hexosa de hidratos de carbono contienen carbonos contiguos, cada uno de los cuales lleva un grupo hidroxilo ( $-OH$ ).
- Las hexosaminas de glucosaminoglucanos contienen carbonos contiguos, uno de las cuales lleva un grupo  $-OH$ , mientras que el otro lleva un grupo amino ( $-NH_2$ ).
- El ácido peryódico escinde la unión entre estos átomos de carbono contiguos y forma grupos aldehído.
- Estos grupos aldehído reaccionan con el reactivo de Schiff para dar un color púrpura distintivo. La tinción PAS de la membrana basal (fig. 1-2) y las fibras reticulares se basa en el contenido o asociación de proteoglucanos (hidratos de carbono complejos asociados con un núcleo de proteína). Esta tinción es una alternativa a los métodos de impregnación argéntica, que también se basan en la reacción con las moléculas de sacáridos en los proteoglucanos.

La reacción de Feulgen se basa en la separación de purinas de la desoxirribosa del ADN mediante una hidrólisis ácida débil; el anillo de los sacáridos se abre a continuación y se forman grupos aldehído. Una vez más, los

grupos aldehído recién formados reaccionan con el reactivo de Schiff para dar el color púrpura característico. La reacción del reactivo de Schiff con el ADN es estequiométrica, lo que significa que el producto de esta reacción es medible y es proporcional a la cantidad de ADN. Por consiguiente, se puede utilizar en los métodos espectrofotométricos para cuantificar la cantidad de ADN en el núcleo de una célula. El ARN no se tiñe con el reactivo de Schiff porque carece de desoxirribosa. (Wojciech , 2015, págs. 3-7)

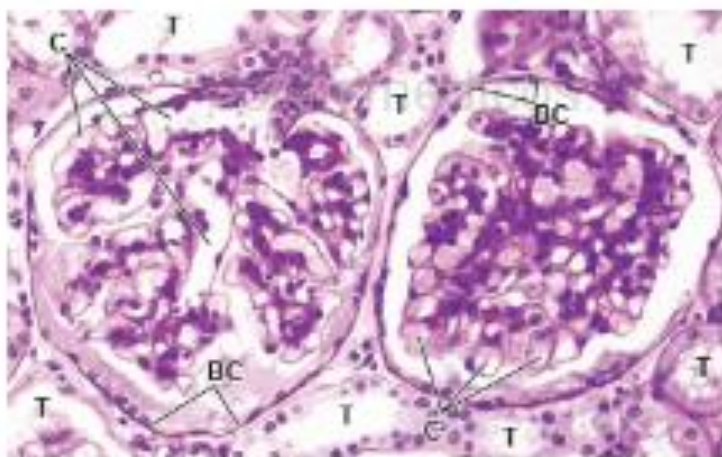


Figura. 8. Fotografía perteneciente a tejido Renal. Coloración PAS. 200 X Capsula de Bowman.

Fuente: *Histología Texto y Atlas Correlación con biología celular y molecular*

La identificación del semen es de suma importancia en la investigación de la violación y otros crímenes relacionados con la agresión sexual. Los procedimientos más comúnmente utilizados para el centro de identificación de semen en la detección de espermatozoides o la detección de la actividad de la fosfatasa ácida prostática; los métodos que implican la detección de antígenos de espermina, colina o semen se emplean con menos frecuencia. Lamentablemente, ninguno de estos procedimientos tiene uno o más problemas importantes. Por ejemplo, los espermatozoides no se encontrarán en el semen de los varones vasectomizados o aspermicos; además, los espermatozoides son mecánicamente lábiles y su identificación inequívoca en las manchas sospechosas de semen a menudo es difícil. Además, los espermatozoides se eliminan de la vagina con bastante rapidez y, por lo tanto, es posible que no se encuentren en los lavados vaginales postcoitales. Por lo tanto, la falta de

detección de espermatozoides en material sospechoso de ninguna manera contraindica el semen. En el caso de la prueba de la fosfatasa ácida, los problemas son diferentes. La fosfatasa ácida no es en absoluto exclusiva del semen o del tejido prostático; esta actividad enzimática es de naturaleza omnipresente. Además, hay evidencia de que la fosfatasa ácida prostática y la fosfatasa ácida encontradas en las secreciones vaginales normales son genéticamente idénticas y que ambas son genéticamente idénticas a la fosfatasa ácida lisosoma que se encuentra en la mayoría de los tejidos; 2 por lo tanto, la base genética de la especificidad de la prueba de la fosfatasa ácida está en cuestión. La prueba cuantitativa solo puede basarse en el nivel extraordinariamente alto de actividad de la fosfatasa ácida en el semen; los bajos niveles de actividad que a menudo se encuentran en los lavados vaginales poscoitales son, por lo tanto, equívocos con respecto a la cuestión de la detección del semen. Las otras pruebas para la identificación del semen son igualmente sospechosas en referencia a su especificidad. De lo anterior, es evidente que sería deseable tener pruebas alternativas para la detección de semen. Una buena prueba alternativa debe cumplir varios criterios. Debe basarse en la detección de un marcador de semen para el que se pueda demostrar la base biológica de la especificidad; esta condición virtualmente dicta que el marcador debe ser una proteína ya que la síntesis de proteína está bajo control genético directo. Para evitar el problema planteado por los varones vasectomizados y aspermicos, el marcador debe ser un componente del plasma seminal. Un buen marcador debe ser estable en las manchas y en el entorno vaginal. Finalmente, debido a que la dilución efectiva del semen en el coágulo vaginal después del coito puede ser tanto como 1: 2000, el marcador debe ser detectable en niveles de trazas.

En este informe, la identificación, purificación y caracterización de un plasma seminal proteína se describe; esta proteína parece satisfacer las condiciones anteriores como un buen semen marcador.

#### Aplicación a situaciones de casos forenses

El problema de la identificación del semen surge principalmente en dos contextos: el análisis de manchas sospechosas y el análisis de lavados vaginales



o torundas. El inmunoensayo para p30 ha sido probado en ambos contextos. La proteína ha sido detectada sin dificultad en extractos de manchas de semen hasta un año de edad; aunque no se probaron otras manchas, aparece p30 para ser bastante estable y probablemente debería sobrevivir en material más antiguo. El éxito con el postcoital los lavados vaginales han sido menos consistentes; p30 ha sido detectado en algunos, pero no en otros.

Esto parece deberse al nivel efectivo de semen en el conjunto vaginal. Como se señaló anteriormente, el antisuero más fuerte usado en este estudio no detectó p30 en plasma seminal diluido más de 1: 128; en consecuencia, p30 no se detectaría en los lavados vaginales que contienen semen a una mayor dilución. Cuando se evaluaron los lavados postcoitales vaginales concentración efectiva de semen (mediante la medición de los niveles de fosfatasa ácida en los lavados) se encontró que aquellos lavados que contenían semen a una dilución inferior a 1: 100 dieron una prueba p30 positiva y aquellos con una dilución efectiva mayor que 1: 100 dieron negativo resultados. Por lo tanto, se necesitarán antisueros más sensibles o pruebas más sensibles para detectar p30 a la mayor dilución encontrada a menudo en los lavados vaginales recolectados en casos de violación.

Se han suministrado antisueros anti-p30 a 14 laboratorios delictivos para pruebas preliminares. La especificidad del antisuero se analizó adicionalmente mediante pruebas de reactividad con una variedad de fluidos y soluciones no probadas en este laboratorio. Ninguno de los materiales probados aparte de él semen produjo una reacción positiva; incluidos entre los materiales que no reaccionan fueron estómago contenido, bilis, leche de vaca, semen de chimpancé, yema de huevo, clara de huevo, café. Con respecto a la detección de rastros de semen en las manchas y en los frotis vaginales, los informes los laboratorios informan hallazgos similares a los descritos anteriormente. Además, el inmunológico la prueba para p30 se ha utilizado con éxito como una prueba de confirmación para la identificación de manchas de semen en varias situaciones de casos. **(Sensabaugh, 1978, págs. 106-115)**

Comparación de la eficacia de la hematoxilina y la eosina, el ácido periódico de Schiff y el ácido fluorhídrico periódico Schiff-Acridine Técnicas

para la demostración de la membrana basal en el liquen plano oral: un estudio Histoquímico

Una membrana basal (BM) es una lámina gruesa de moléculas de la matriz extracelular, sobre la cual las células epiteliales se unen y forman un límite entre el epitelio y el tejido conectivo. También proporciona soporte estructural para las células epiteliales, mesoteliales y endoteliales y rodea a los adipocitos, los músculos y las células de Schwann. Varios estudios inmunohistoquímicos han demostrado el papel de los componentes del BM en enfermedades inflamatorias y autoinmunes como liquen plano, pénfigo, penfigoide, donde el BM y las células basales son los principales objetivos. Para comprender su papel exacto en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, se han llevado a cabo varios estudios inmunohistoquímicos en el pasado, pero estas técnicas de tinción avanzadas son caras y no factibles en los laboratorios de rutina.

El liquen plano oral (OLP) es una enfermedad inflamatoria autoinmune y mucocutánea cuya etiología es desconocida. Afecta la piel, la mucosa genital, el cuero cabelludo, las uñas y las áreas de la cavidad oral, cuyo diagnóstico clínico puede confirmarse mediante los hallazgos histopatológicos clásicos. OLP fue descrito por primera vez por un médico británico Erasmus Wilson en 1869. La inflamación crónica puede conducir a una transformación maligna; por lo tanto, el diagnóstico precoz es importante ya que muchos estudios han respaldado la transformación maligna de la OLP. El liquen plano tiene una prevalencia variada en función de las diferentes regiones geográficas. OLP afecta a personas de todos los grupos étnicos. Muchos estudios han demostrado que el liquen plano es una enfermedad de mediana edad y solo el 4% de los casos ocurre en niños.

Durante casi 100 años, los patólogos han utilizado tinciones histoquímicas especiales para ayudar en el diagnóstico basado en los tejidos. Aunque las tinciones de hematoxilina y eosina (H-E) son manchas muy populares entre Histotecnólogos y patólogos para observar biopsias y muestras quirúrgicas y

post mortem, este método tiene algunas limitaciones. Aquí es donde las manchas especiales son útiles: para identificar microorganismos o estructuras o moléculas específicas en células o en secciones de tejido. La terminología de "tinción especial" se usa con mayor frecuencia en el entorno clínico, y simplemente significa cualquier técnica que no sea el método H-E que se utiliza para impartir colores a una muestra. Aunque la presencia de la MO se puede detectar muy específicamente mediante métodos inmunohistoquímicos en secciones de tejido incluidas en parafina, los antisueros antikeratina no son económicos y consumen mucho tiempo.

Por lo tanto, este estudio fue diseñado para demostrar la eficacia de la tinción de acriflavina en comparación con H-E y tinción con ácido peryódico Schiff (PAS). El presente estudio se realizó para evaluar los cambios en el BM del liquen plano bajo el microscopio óptico y el microscopio de fluorescencia utilizando una tinción histoquímica que podría ser rentable, consumir menos tiempo y ser inequívoca para la observación de la zona BM.

Una BM es una unión simple y plana que permite que las fuerzas aplicadas en la superficie del epitelio se dispersen en una mayor área de tejido conectivo. Las interacciones epitelio-mesenquimales son necesarias para el desarrollo del epitelio oral durante la embriogénesis, pero el epitelio oral del adulto también está bajo la influencia del tejido mesenquimal, tanto en condiciones normales como neoplásicas. BM ayuda en la comunicación epitelio-mesenquimal de dos maneras: es un tamiz dinámico que puede controlar el paso de moléculas entre los dos tejidos y proporciona una configuración espacial a la cual las células mesenquimales pueden reaccionar.

Una BM actúa como un filtro macromolecular selectivo e influye en la morfología y citodiferenciación del crecimiento. También funciona como una barrera para el paso de las células tumorales malignas, el andamio para la morfogénesis de las glándulas salivales y la regeneración tisular. También juega un papel en la odontogénesis y la patología tumoral odontogénica.

En el laboratorio de histopatología, la tinción con H-E se considera rutinaria y, a menudo, se la conoce como el "estándar de oro". Se utilizan muchas tinciones especiales para la identificación del BM, entre ellas el PAS se usa con mayor frecuencia. Los usos del método PAS en histopatología incluyen la detección de glucógeno que se almacena en mayores cantidades en algunas enfermedades hereditarias, teñiendo las glándulas renales glomerulares ricas en glucosa anormalmente gruesas en la diabetes mellitus. Muy a menudo, PAS se considera una tinción estándar para todos los tejidos productores de moco, pero esto no siempre es posible. El glucógeno y algunos tipos de moco se tiñen fuertemente con PAS, mientras que las fibras de BM y colágeno se tiñen con menos fuerza. BM está formado por fibras finas de reticulina y fibrillas finas de tipo III y IV de colágeno integradas en una matriz rica en carbohidratos. Aunque BM es PAS positivo, la reticulina puede mostrarse con mayor contraste oxidando con peryodato y detectando los aldehídos resultantes con una solución de nitrato de plata amoniacal, que deposita plata coloidal negra.

De la literatura se sabe que en la tinción H-E, una BM se ve como una fina línea eosinofílica debajo del epitelio, mientras que PAS muestra una BM como una línea magenta fina. El ácido periódico fluorescente-acriflavina muestra una BM como color naranja dorado. La búsqueda bibliográfica no reveló ningún estudio que comparara las tres tinciones para la demostración de una BM.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue teñir la membrana basal en secciones de tejido con H-E, PAS y ácido periódico fluorescente-acriflavina y comparar la eficacia de estas tinciones entre sí para determinar la mejor técnica de tinción posible para la BM.

El método de tinción H-E como estándar de oro implica la aplicación de haemalum, que es un complejo formado por iones de aluminio y hematoxilina oxidada. Pero algunas estructuras no se tiñen bien. Por ejemplo, las láminas basales deben teñirse con tinción PAS o con algunas manchas de plata, si deben ser bien visibles. Las fibras reticulares también requieren tinción de plata.

El presente estudio según nuestro conocimiento es el primer estudio que documenta y compara la tinción H-E, PAS y acriflavina para una BM. Por lo tanto, este estudio se suma a la literatura limitada sobre la aplicación de acriflavina en secciones de tejido incluidas en parafina y es comparable a la tinción H-E y PAS para teñir una BM. Del estudio y análisis de datos antes mencionado, se puede concluir que la continuidad y el contraste, el patrón homogéneo, el patrón fibrilar de un BM se demostraron mejor con acriflavina seguida de PAS. La acriflavina es un procedimiento de tinción fácilmente disponible, que consume menos tiempo y también una delineación claramente mejorada de los detalles de la estructura y el contraste de color de una BM. Se requieren más estudios para respaldar la conclusión mencionada. **(Pujar, Pereira, Tamgadge, Bhalerao, & Tamgadge, 2015, págs. 450-456)**

**El ácido periódico de Schiff (PAS)** es otra tinción especial comúnmente utilizada en el laboratorio de histología.

### **¿Qué mancha PAS?**

(1) **Polisacáridos:** la técnica se usa comúnmente para identificar polisacáridos: estas macromoléculas están compuestas de unidades monosacáridas unidas por enlaces covalentes. El principal polisacárido identificado mediante tinción histológica en secciones de tejido humano y animal es el glucógeno. Esto está presente en numerosos tejidos, incluidos el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado y el riñón.

(2) **Sustancias de moco neutro:** también se usa comúnmente para teñir e identificar sustancias de moco neutro. Estos pueden incluir glicoproteínas, glicolípidos y mucinas neutras, que son producidas por células epiteliales en diferentes órganos.

(3) **Membranas basales** tisulares: estas capas delgadas de tejido conjuntivo reticular positivas al PAS anclan y apoyan el epitelio y el endotelio al tejido conectivo subyacente.

(4) **Organismos fúngicos:** las paredes celulares de algunos organismos fúngicos contienen altos niveles de carbohidratos y también manchan el PAS positivo. Sin embargo, esto solo funciona en hongos vivos.

### **Principios generales de la mancha**

La reactividad de la técnica de PAS se basa en la estructura de las unidades de monosacáridos.

La primera reacción en la tinción implica ácido periódico que actúa como un agente oxidante para oxidar los enlaces carbono-carbono entre dos grupos hidroxilo adyacente. Esto produce grupos de aldehídos reactivos de Schiff.

En la segunda reacción, la sección de tejido reacciona con el reactivo de Schiff. Esto comprende una mezcla de fucsina básica, ácido clorhídrico y metabisulfito de sodio. La fucsina básica en la mezcla reacciona con grupos aldehído recién formados en el tejido para producir un color magenta brillante.

Finalmente, cuando la sección se enjuaga en agua, las moléculas de fucsina en el tejido se unen y producen un color magenta brillante. La intensidad del color es proporcional a la concentración de grupos hidroxilo presentes originalmente en las unidades de monosacáridos.

La hematoxilina entonces se usa típicamente como una tinción de contraste para visualizar otros elementos tisulares. Sin embargo, cuando se usa PAS para demostrar organismos fúngicos, se prefiere una contra tinción de color verde claro.

La **digestión con diastasa** (alfa-amilasa) también se puede usar para ayudar en el diagnóstico de enfermedades de almacenamiento de glucógeno. La diastasa hidroliza los productos de almidón, glucógeno y descomposición que se originan en estos polisacáridos tisulares. Cuando se compara con un

portaobjetos de tejido que contiene glucógeno, un portaobjetos de extracción de diastasa no tendrá tinción de PAS visible.

### **Característica histológica Color con PAS**

Glucógeno, membranas basales, sustancias mucosas, organismos fúngicos Magenta

Núcleos azules (con contratinción de hematoxilina)

Otros elementos de tejido verde (con contratinte verde claro)

### **¿Quién usa PAS Stain?**

Esta mancha se usa ampliamente para fines de diagnóstico e investigación. Por ejemplo, los investigadores que estudian enfermedades de almacenamiento de glucógeno o enfermedades de la membrana basal pueden examinar rutinariamente secciones de tejidos teñidas con PAS para evaluar estos elementos respectivos en tejidos de interés.

En los laboratorios de diagnóstico, los patólogos a menudo usan esta tinción para ayudar a responder las preguntas que puedan surgir después de examinar las secciones teñidas con hematoxilina y eosina de rutina. En particular, se puede usar para ayudar con el diagnóstico de:

Enfermedades de almacenamiento de glucógeno: estas son condiciones en las que se almacenan cantidades excesivas de glucógeno en el hígado, los músculos o el riñón. El PAS a menudo se utiliza rutinariamente en la clínica para demostrar la acumulación de glucógeno en las biopsias de estos tejidos.

Tumores: los gránulos de glucógeno también pueden estar presentes en algunos tumores, incluidos algunos que surgen en tejidos como el páncreas, los pulmones y la vejiga.

Infección por hongos: el PAS se puede usar para visualizar algunos organismos fúngicos en las secciones de tejido.

Membranas basales: como PAS se puede utilizar para resaltar las membranas basales de los tejidos, se puede utilizar para identificar trastornos en los que existe debilidad o un funcionamiento inadecuado de las membranas basales, como en el caso de algunas enfermedades glomerulares en el riñón. (Parry, , 2018)

### **Mecanismo de unión directa colorante-sustrato**

La unión colorante-sustrato, entendiendo por sustrato los tejidos orgánicos preparados para su coloración, se realiza principalmente por uniones electrovalentes entre grupos catiónicos o aniónicos del tejido con restos aniónicos o catiónicos del colorante, respectivamente. Aunque existen otras fuerzas de unión no son de importancia práctica para entender el mecanismo de la coloración

Hemos dicho ya que hay colorantes básicos o catiónicos, que son aquellos en los que el grupo que está ionizado y dispuesto a unirse a grupos aniónicos del tejido es el radical  $-NH_2$ . En el caso de los colorantes ácidos el grupo que les da dicho carácter suele ser el grupo sulfónico. Parece obvio que, si las uniones son electrovalentes, los colorantes básicos se unirán con grupos ácidos, esto es, con cargas negativas del sustrato y lo contrario ocurrirá con los colorantes ácidos. En el tejido existen normalmente tres posibilidades de grupos ácidos: los grupos carboxilos ( $-COOH$ ) de proteínas y carbohidratos, los fosfóricos ( $-PO_3H_2$ ) de los ácidos nucleicos y los sulfatos ( $-SO_3H$ ) de los carbohidratos ácidos (Scott, 1989). En cuanto a los grupos básicos, el más importante y que merece especial mención es el grupo  $-NH_2$ , el grupo imidazol de la histidina y el guanidilo de la arginina, todos ellos en las proteínas

Dado que las uniones sustrato-colorante dependen del grado de ionización de los grupos ácidos y básicos de ambos componentes de la reacción, es evidente que el pH es uno de los parámetros más importantes a considerar en este tipo de reacciones.

### **Introducción a la histoquímica de los carbohidratos**

A efectos prácticos la Histoquímica se divide en los mismos apartados que la Bioquímica y tendremos así, una Histoquímica de Carbohidratos, una



Histoquímica de Proteínas, otra de Lípidos, etc. Obviamente, cada uno de estos apartados de la Histoquímica exige un conocimiento, aunque sea mínimo, de las entidades químicas correspondientes. Por lo tanto, creemos que es necesario dar primero un repaso a cada uno de los capítulos de la Bioquímica, antes de entrar en la descripción de los métodos histoquímicos con los que se pretenden demostrar los grupos funcionales de carbohidratos, proteínas, lípidos, o bien, actividades enzimáticas, en los cortes tisulares.

### Glicosaminoglicanos unidos a proteínas o proteoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG), llamados anteriormente *Mucopolisacáridos ácidos* (Meyer, 1969) se encuentran todos unidos a un eje proteico, menos el ácido hialurónico (HA), que se da en cadenas polisacáridos libres. Los complejos de GAGs y proteínas reciben el nombre de *proteoglicanos* (PG). Los restantes glicosaminoglicanos, unidos todos y cada uno de ellos a un eje proteico, son los *galactosaminoglicanos*, *condroitín sulfatas* (CS) y *dermatán sulfatas* (DS) y las *glicosaminoglicanos*, *heparán sulfatas* (HS), la *heparina* y los *queratán sulfatas* (KS). Son, pues, seis variantes cuya heterogeneidad se ve aumentada por la localización y el grado de sulfatación de sus unidades sacáridas. Todos los GAGs son polímeros de un dimero con la fórmula general

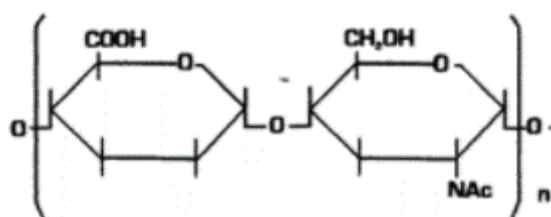


Figura. 9. Representación estructural del Mucopolisacáridos.

Fuente: *Histoquímica de hidratos de Carbono o glúcidos. Laboratorio de Anatomía Patológica.* Madrid, España: Interamericana McGraw Hill,.

El ácido hialurónico, componente importante del tejido conjuntivo, carece de grupos sulfatos. Los restantes GAGs están todos sulfatados, siendo el heparán sulfato y la heparina los que lo están en mayor grado. La sulfatación tiene lugar en los C3, C3 y C6, C6, en el amino del C2 y, en este, más el C6.

La unión de los GAGs con el eje proteico tiene lugar en los restos serinas del eje proteico, mediante una cadena constituida por ácido glucurónico → galactosa → galactosa xilosa → O de la serina. Las funciones de los PGs van de las estrictamente mecánicas, hasta las de diferenciación celular y morfogénesis, pasando por las de adhesión y motilidad (Kjellen y Lindahl, 1991).

### **Glicoproteínas**

Este grupo de proteínas, generalmente localizadas en las membranas celulares, a las que atraviesan, tienen una importante misión en el reconocimiento intercelular. Los restos carbohidratados se localizan siempre en el extremo de la proteína situada en el espacio extracelular y dada la extraordinaria hidrofilia de estos restos constituyen un considerable impedimento al giro de la glicoproteína para un eventual cambio de dirección.

Las unidades carbohidratadas se unen, bien al nitrógeno amídico de la asparagina, bien al átomo de oxígeno de la serina o de la treonina y el carbohidrato que realiza dicha unión es usualmente la Nacglucosamina o la Nacgalactosamina.

Los oligosacáridos unidos al N amídico de la asparagina tienen una estructura común que consiste en tres *mañosas* y dos restos *Nacglucosamina*. Existen dos tipos estructurales según que tengan restos *mañosas* añadidos (oligosacáridos con elevado contenido en *mañosa*), como se ve en la figura 1, o que tengan restos de Nacglucosamina, galactosa, fúcosa y ácido siálico (oligosacáridos complejos) como se muestra en la figura 2. Los oligosacáridos contienen siete clases diferentes de restos azucarados: glucosa, galactosa, Nacglucosamina, Nacgalactosamina, manosa, fucosa y ácido siálico, unidos por enlaces glicosídicos de clases muy variadas, lo que les da una gran diversidad. Esta diversidad se refleja en sus múltiples funciones entre las que hay que incluir a los grupos sanguíneos y al reconocimiento intercelular.

Las lectinas, proteínas de origen vegetal o animal, con una especificidad selectiva por estos restos carbohidratados de la superficie celular, se usan para el análisis de estos componentes de membrana.

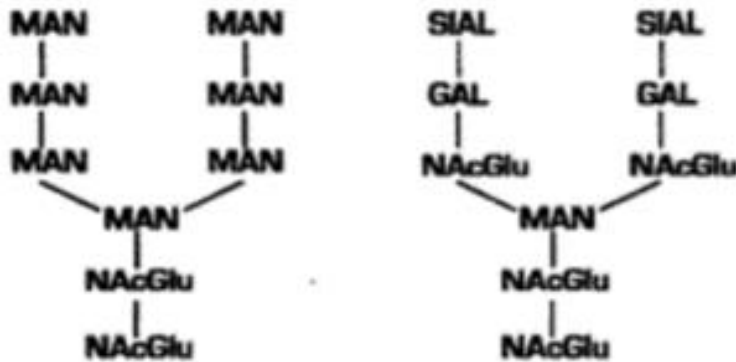


Figura 10., Representan dos posibilidades de constitución química de carbohidratos de membrana.

Fuente: *Histoquímica de hidratos de Carbono o glúcidos. Laboratorio de Anatomía Patológica.* Madrid, España: Interamericana McGraw Hill,.

### **Métodos histoquímicos para carbohidratos**

En nuestra brevísima incursión por la Bioquímica de los carbohidratos, hemos tomado contacto con las entidades cuya presencia en los tejidos se quiere demostrar Hemos de decir, sin embargo, que no contamos con métodos que nos permitan asegurar la presencia en ellos de las entidades bioquímicas como tales. Casi todos los métodos de que disponemos lo son para demostrar restos o grupos funcionales que, indirectamente nos hablan de la presencia de las entidades que los poseen. Sin embargo, puesto que los grupos funcionales pueden encontrarse, a veces, en entidades químicas muy distintas, un resultado positivo nos plantea nuevas interrogantes. Tenemos necesidad, entonces, de otros métodos auxiliares que nos descarten algunas entidades a favor de otras En suma se trata de un análisis similar al que realiza el químico con una muestra determinada.

Una vez convencidos de los límites dentro de los cuales nos movemos, pasamos a analizar los métodos que se pueden emplear en el área de los carbohidratos. En las hexosas y pentosas encontramos grupos glicoles, que pueden ser oxidados a aldehidos, grupos carboxilos, en los ácidos hexurónicos

o en los ácidos siálicos, grupos sulfatos en los dímeros de los glicosaminoglicanos, etc. Contamos con un método para la demostración de aldehidos procedentes de la oxidación de alcoholes, el PAS, y métodos para la demostración de restos ácidos o aniónicos, los colorantes catiónicos.

Muy recientemente se han aplicado una serie de reactivos para el estudio de carbohidratos que tienen una gran especificidad por determinados monosacáridos, es decir, por unas determinadas conformaciones estéricas, las lectinas

Finalmente, como técnicas auxiliares para completar el estudio analítico del contenido carbohidratado de un tejido, disponemos de dos grupos de ellas: (a) los bloqueos de grupos funcionales en cuestión y (b) los tratamientos enzimáticos específicos. Resumiendo:

- 1 Demostración de grupos glicoles, hidroxiaminos, hidroxialquilo- amino e hidroxiceto vecinales (técnica del PAS).
- 2 Demostración de grupos aniónicos (colorantes básicos).
3. Demostración de conformaciones monosacáridas específicas (lectinas).
- 4 Bloqueos de grupos funcionales (acetilación, metilación).
5. Tratamientos enzimáticos (amilasa, neuraminidasa, hialuronidasa).

Estos cinco puntos con sus técnicas correspondientes se desarrollan en este y en *temas* sucesivos.

### **Reacción de PAS (*Periodic Acid-Schiff*)**

Una de las reacciones químicas para carbohidratos, más conocidas, es la oxidación de glicoles, usada en química por Malaprade (1928), para la valoración de dichos glicoles, y por Nicolet y Shinn (1935) para la estimación de aminoalcoholes.

La introducción de esta reacción en histoquímica se debe a Mac Manus (1946) y su inmediato desarrollo a Lillie (1949) y Hotchkiss (1948). En resumen, la reacción consiste en una oxidación con ácido peryódico, seguida de la aplicación del reactivo de Schiff, ideado por este químico en 1866. Este reactivo sirve para demostrar la presencia de aldehidos en una muestra tisular y posee

una alta sensibilidad A continuación analizaremos, los dos pasos de la técnica, con algún detalle.

La oxidación se realiza, como acabamos de decir, con ácido peryódico.

En concentraciones que pueden variar entre el 0,5 al 1,0% en agua des-tilada, durante 10 minutos a temperatura ambiente La oxidación de alcoholes procede normalmente hasta la formación de ácidos, a través de la función aldehido.



Figura. 11. Oxidación de alcoholes.

Fuente: *Histoquímica de hidratos de Carbono o glúcidos. Laboratorio de Anatomía Patológica.* Madrid, España: Interamericana McGraw Hill,.

El grado de oxidación, equivalente en este caso al grado de oxigenación, es mayor de izquierda a derecha, Sin embargo, usando un oxidante suave a concentración, tiempo y temperatura adecuados, podemos quedarnos en el punto medio y esto es lo que ocurre cuando se oxida con ácido peryódico en las condiciones adecuadas

El mecanismo de reacción, tal como se da en los polisacáridos, es como sigue:

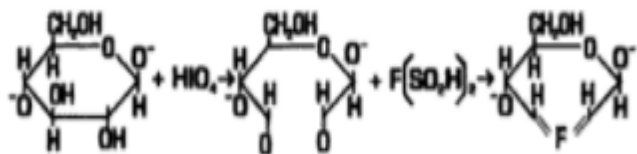


Figura 12. Oxidación de la hexosa para obtener grupos aldehidos en los C 2 y C3. La F representa al reactivo Schiff.

Fuente: *Histoquímica de hidratos de Carbono o glúcidos. Laboratorio de Anatomía Patológica.* Madrid, España: Interamericana McGraw Hill,.

La oxidación tiene lugar, pues, en los carbonos 2 y 3, en sus restos alcohólicos vecinales o Vic-glicoles y el reactivo Schiff básica se añade, como se indica en el esquema, entre los carbonos 2 y 3

### **El reactivo de Schiff**

Este reactivo fue diseñado por Schiff en 1866, para demostrar la presencia de grupos aldehidos en solución y su sensibilidad es, como hemos dicho, muy elevada.

El mecanismo de la reacción, en el caso de la demostración de grupos aldehidos, obtenidos por oxidación con ácido peryódico y aplicación subsiguiente del reactivo de Schiff no se conoce aún con certeza. Aceptamos, pues, la formulación simplificada que da Piarse (1972) para los aldehidos producidos por oxidación, como se ha dado más arriba. El color que da esta reacción suele designarse como rojo magenta.

### **Preparación del reactivo de Schiff**

Aunque el reactivo de Schiff puede obtenerse en el comercio, y el de la casa Merck es especialmente recomendable, este reactivo se puede y se debe saber preparar en el laboratorio. Existen diversas formas de prepararlo, pero nosotros hemos seguido siempre la de Lillie (1965), a la que suele llamarse "preparación en frío", la cual es fácil y cómoda de realizar.

La preparación del reactivo en frío, según Lillie (1965), es como sigue:

1. Pesar 1 g de Fuchina básica y 1,9 g de metabisulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ ), y disolver en 100 ml de Hall 0,15 N.
2. Agitar a intervalos o en un agitador mecánico durante 2 horas. La solución se aclara en ese tiempo y toma un color marrón pálido.
3. Añadir 500 mg de carbón activo fresco y agitar durante unos 2 minutos.
4. Filtrar en una probeta graduada, lavando lo que quede en el papel de filtro con un poco de agua destilada para restaurar el volumen original de los 100 ml. Guardar en refrigeración.

Para otras formas de preparación, véanse los textos de Lillie (1965) o de Piarse (1972).

### **Procedimiento para realizar la reacción del PAS**

1. Desparafinar los cortes en xileno, hidratar en etanoles de graduación descendente y pasar al agua destilada
2. Cubrir los cortes con una solución de ácido peryódico al 0,5-1%, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar bien con agua destilada
4. Cubrir de 10 a 15 minutos con el reactivo de Schiff, que se habrá sacado previamente del refrigerador para que alcance la temperatura ambiente.

NOTA: Hay que guardar ciertas precauciones en el manejo de este reactivo debido a las manchas de color rojo que dejan allí en donde cae Para ello debe usarse pipeta Pasteur desechable, cada vez que se saca una porción del reactivo, para cubrir él o los cortes que se van a usar.

5. Los cortes deben lavarse abundante y rápidamente con agua destilada y luego con agua de la llave. Algunos autores usan un primer lavado con agua sulfurosa, es decir, solución de metabisulfito sódico en HC1 0,15 N, aunque esto no es absolutamente imprescindible según otros. Si se usa la solución sulfurosa hay que tener cuidado de no aspirarla directamente por la fuerte acción pungente que posee
6. Finalmente, los cortes son deshidratados, aclarados en xileno y cubiertos con una resina sintética (Permont, DPX o cualquier otra).

RESULTADOS: Los lugares positivos adquieren un color rojo magenta de variable intensidad según el contenido en aldehidos creados por el periódico. **(Montero, 1997, págs. 37-53)**

### **Tinción e identificación de carbohidratos: consideraciones teóricas**

Debemos ocuparnos aquí de las reacciones de Schiff-Feulgen y PAS, acetilación, saponificación, sulfatación, reacción con Schiff y ácido peryódico,

metacromasia, colorantes con afinidad especial por los Mucopolisacáridos ácidos, extinción del azul de metileno y digestión enzimática.

### **Reactivo de Schiff y reacción de Feulgen-Schiff**

La fucsina básica es una mezcla de tres colorantes de tipo triaminotriifenilmetano: rosanilina, pararrosanilina y magenta II (Conn, 1961; Gurr, 1960, 1962). Hace un siglo, H. Schiff (1866) demostró que los aldehídos devuelven su color magenta a la fucsina que fue blanqueada (leuco-fucsina) por el bióxido de azufre. La leucofucsina es incolora porque su doble enlace cromóforo fue destruido, y por lo tanto desapareció la estructura quinoide. Una nueva oxidación, por ejemplo mediante exposición duradera al aire y a la luz, permite que se vuelva a formar el doble enlace y reaparezca el color.

La estructura quinoide puede recuperarse también por efecto de los aldehídos, pero en este caso el compuesto aldehídico se une al “compuesto fucsina-ácido sulfurónico”, y el tono del color púrpura rojizo que se obtiene cambia ligeramente según la naturaleza del compuesto de adición.

Debe insistirse en que el compuesto de adición aldehidofucsina que presentamos en la figura 42-2 quizá no sea el que se forma en realidad; esto ha sido tema de discusión y estudios durante más de un siglo. Se propusieron dos interpretaciones principales de la reacción: 1) formación de un ácido aminosulfínico, seguida de fijación del aldehído; y 2) formación de un ácido amino- alquilsulfónico. Se cree actualmente que la teoría acertada es la segunda. Hardonk y van Duijn (1964a, b), opinan además que el grupo  $\text{NHSO}_2\text{CHOHR}$  no parece coincidir con los resultados recientes, lo que supone que debe tener lugar un re arreglo tal que aparezca entre el colorante y la substancia que contiene el aldehído un enlace de tipo  $\text{NH-CHR-SO}_3\text{H}$ .

Feulgen descubrió que la hidrólisis ácida suave de tejidos fijados permitía exponer la desoxipentosa de los núcleos bajo forma de un aldehído potencial, pero todavía unido a la cadena de ácido nucleico por enlaces fosfato. En 1924, junto con Rossenbeck, describió lo que se conoce actualmente como reacción de Feulgen o Feulgen-Schiff para el ácido desoxirribonucleico (DNA): hidrólisis



ácida leve seguida de exposición a reactivo de Schiff, produciéndose un color púrpura rojizo en las estructuras que contienen DNA (núcleos y algunos virus). El ácido ribonucleico (RNA), que contiene ribosa (en lugar de la desoxirribosa del DNA), no da la reacción de Feulgen, pues el grupo glicol de esta ribosa queda substituido por fosfato.

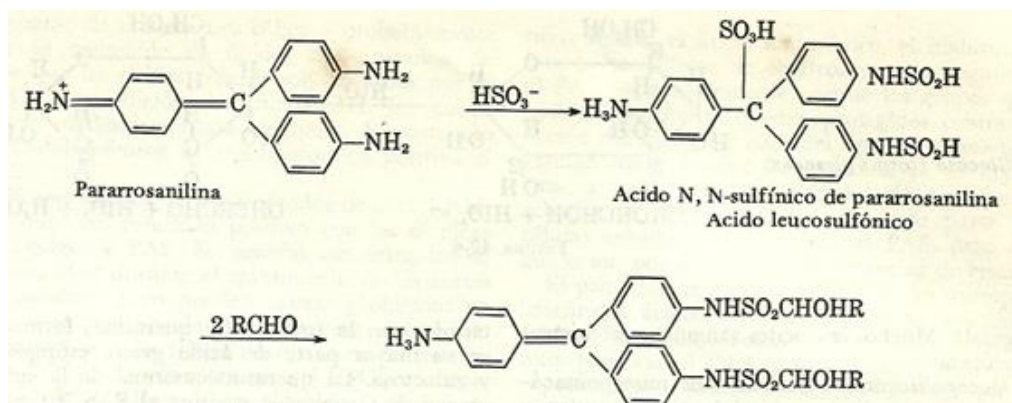


Figura 13. Reactivo de SHIFF. Producto de adición coloreado de tipo de dialdehído.

Fuente: Lynch, M., Raphael, S., Mellor, L., Spare, P., & Inwood, M. (1987). *Métodos de Laboratorio* (2 ed., Vol. 2). Mexico: Interamericana

## Reacción PAS

En 1928, Malaprade utilizó por primera vez el ácido peryódico ( $\text{HIO}_4$ ) para la medición química de los polialcoholes. En 1946, McManus aplicó la reacción del ácido peryódico y Schiff a los estudios histológicos. El ácido peryódico oxida los compuestos que poseen grupos hidroxilo libres: cuando los grupos OH son vecinos, por ejemplo, en los 1,2-glicoles ( $\text{CHOH-CHOH}$ ), se rompe el enlace entre los átomos de carbono yuxtapuestos unidos a grupos OH, apareciendo una fórmula de tipo di aldehído; asimismo, el ácido peryódico ataca los alcoholes substituidos un aldehído ( $\text{HCHO}$ ) y un carboxilo ( $\text{COOH}$ ); en las dicetonas alfa se tienen dos grupos carboxilo, y la aplicación ulterior del reactivo de Schiff no produce color. Evidentemente, la fórmula en di aldehído debida a oxidación de la glucosa por  $\text{HIO}_4$  produce una intensa reacción con el reactivo de Schiff, y lo mismo ocurre con la galactosa, mañosa, fucosa (metilpentosa) y hexosamina. Como regla general, la intensidad de la reacción PAS es proporcional al contenido de estos azúcares en la substancia estudiada. Por ejemplo, el enlace 1-3

entre el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina en el ácido hialurónico impide la oxidación que daría lugar a grupos aldehído; por consiguiente, el ácido hialurónico es negativo al PAS. **(Lynch, Raphael, Mellor, Spare, & Inwood, 1987, págs. 1204-1205)**

### **Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico**

La tinción de hematoxilina y eosina (HE) se utiliza rutinariamente en histopatología para analizar diferentes tejidos del organismo, incluyendo cortes de piel. Sin embargo, esta técnica no permite apreciar elementos como fibras elásticas o mastocitos, ni diferencia entre pigmento melánico y hemosiderina, de modo que obliga a recurrir a tinciones secundarias o especiales, entre ellas el ácido peryódico de Schiff (PAS), para visualizar microorganismos; la tinción de Gomori-Grocott (metenammina de plata) para hongos; y las de Ziehl-Neelsen y Kinyoun para identificar actinomicetos y micobacterias.<sup>1</sup>

Otros medios empleados en la detección de microorganismos incluyen; Giemsa, para Leishmania; Wathin-Starry para espiroquetas; y mucicarmín, que tiñe la cápsula de *Cryptococcus* sp.<sup>2</sup>

Después de HE, la tinción PAS es la más comúnmente utilizada, pues evidencia algunos polisacáridos (particularmente, glucógeno), así como las mucoproteínas que contienen mucopolisacáridos neutros. Esta técnica es útil para valorar la degeneración fibrinoide, ya que tiñe de rojo los depósitos de fibrina (Fotografía 1) y permite visualizar elementos infecciosos como parásitos y hongos<sup>2</sup> (cuyas paredes de celulosa y quitina contienen polisacáridos).<sup>3</sup> Aun así, no es posible diferenciar morfológicamente los dermatofitos y otros mohos con la tinción de PAS, de modo que el cultivo es el único método para identificar el género y la especie del organismo.

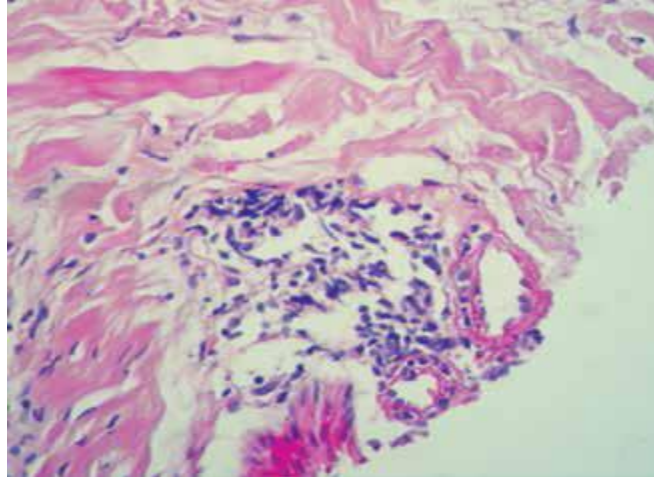


Figura 14. Degeneración fibrinoide de vasos sanguíneos (PAS 40x).  
Fuente: *Histología Texto y Atlas Correlación con biología celular y molecular*

Como agente oxidante que rompe algunas cadenas de carbón convirtiéndolas en dialdehídos, la tinción de PAS se considera parte de la histoquímica moderna de mucopolisacáridos, mucoproteínas y polisacáridos. La reacción se debe a que el ácido peryódico oxida las uniones carbono-carbono de los carbohidratos donde hay hidroxilos adyacentes y NH<sub>2</sub> primarios o grupos amino secundarios, cediendo aldehídos que pueden reaccionar con el reactor Schiff, responsable de la coloración roja provocada por la unión de leucofucsina con dialdehido.

La demostración del glucógeno con tinción de PAS tiene valor diagnóstico en casos de tumor/quiste triquilemal, triquilemoma, hidradenoma de células claras y poroma ecrico debido al glucógeno presente en las células de la corteza externa del pelo y en las glándulas tanto ecrinas como apocrinas. Entre tanto, la presencia de mucopolisacáridos neutros apunta al diagnóstico de enfermedad de Paget mamaria y extramamaria, hidradenoma de células claras, espiradenoma ecrico intraluminal y poroma ecrico. PAS también se utiliza para revelar la membrana basal de epitelios, anexos y vasos, por lo que es útil para diferenciar o resaltar algunos tipos celulares y la distribución del colágeno entre células neoplásicas.

Por último, la tinción con PAS puede arrojar falsos positivos en algunas dermatosis al teñir de rojo elementos como paraqueratosis, células polimorfonucleares o partículas de almidón.

## Conclusiones

Aunque la tinción PAS es una de las técnicas más comúnmente utilizadas en dermatopatología, su uso no es rutinario y de hecho, se practicó en menos de 5% de los estudios histopatológicos revisados para este trabajo. Si bien nuestra revisión arrojó 9.3% de falsos negativos, los hallazgos de los verdaderos positivos contribuyeron de manera significativa al diagnóstico, de allí que la tinción PAS deba estar disponible en cualquier hospital que cuente con un servicio de patología. **(Serviansky, Kresch, Moreno, Arenas, & Vega , 2013, págs. 13-18)**

## Histoquímica de los hidratos de carbono

La **histoquímica** es la aplicación de reacciones químicas y bioquímicas en la técnica histológica, con el fin de localizar y determinar de manera científica ciertas sustancias o su actividad.

En todas estas reacciones o bien se tiñe la sustancia que buscamos o los colorantes reaccionan químicamente con ella, como es el caso del PAS.

Los hidratos de carbono o glúcidos son polialcoholes oxidados (polihidroxicetonas o polialdehidos). Los polisacáridos son glúcidos formados por la unión de muchas moléculas de monosacáridos (más de 10). Entre los polisacáridos además de los polisacáridos simples como el glucógeno destacan los polisacáridos complejos.

Los polisacáridos complejos se dividen en 3 grandes grupos:

Mucopolisacaridos que pueden dividirse en:

- Mucopolisacaridos neutros
- Mucopolisacaridos ácidos
- Mucoproteínas
- Mucolípidos.

## **Reacciones histoquímicas basadas en la demostración de grupos carbonilo formadas sobre los hidratos de carbono por oxidación previa.**

### **Técnica del PAS (Ácido Periódico Schiff)**

Consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido periódico ( $\text{HIO}_4$ ) para incrementar el número de grupos carbonilo (aldehído o cetona) presentes en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente mediante reactivo de Schiff.

Los hidratos de carbono contienen grupos carbonilos relativamente aislados, en una proporción aproximada de uno por molécula de monosacárido. Precisamente por ello es necesario oxidarlos con el fin de incrementar dichos grupos, que solo pueden ser detectados por el reactivo de Schiff si se encuentran situados en carbonos contiguos y delimitados por grupos alcohólicos o amino.

Para los grupos aldehidos que aparecen en posición 1,2 glicol estas condiciones se cumplen exclusivamente tras la oxidación de los correspondientes radicales hidroxilos.

### **Procedimiento Técnico:**

#### **Fijación:**

- Formol al 4 % o Líquido de Carnoy o Bouin.
- Ácido Periódico.....0.5 % p/v.
- Reactivo de Schiff:
  - Fucsina básica (CI: 42510)..... 1g.
  - Agua destilada..... 200 ml.

Disolver la fucsina en 200 ml de agua (d) hirviendo.

Dejar enfriar hasta aproximadamente  $50^\circ\text{C}$ . y filtrar

Posteriormente agregar 20 ml de HCl 1N. Después enfriar hasta 25° C y añadir 1g de Bisulfito sódico o Metabisulfito potásico (sódico).

Mantener en la oscuridad. El líquido tarda unos 2 días o a veces 24h en tornarse de color amarillo que indica que está listo para su uso.

Añadir 2g de carbón activado, mezclar y filtrar hasta que desaparezca el color.

La solución debe conservarse en el refrigerado protegido de la luz.

- Baño de Ácido Sulfuroso o Agua sulfurosa:
- Ácido Clorhídrico (HCl) 1N..... 5 ml.
- Metabisulfito sódico 10 %..... 6 ml.
- Agua (d)..... 100 ml.
- Colorante de contraste: Hematoxilina, Orange G o Van Gieson.

#### **Técnica de Tinción:**

- Desparafinar e hidratar (xilol y decrecientes alcoholes)
- Ácido periódico 0.5 %..... 5 min.
- Lavar en agua (d).
- Reactivo de Schiff.....15- 30 min.
- Aclarar en 3 baños de agua sulfurosa..... 2 min. Cada uno.
- Lavar en agua corriente
- Colorante de contraste
- Lavar con agua corriente.
- Deshidratar, aclarar y montar.

## **Resultados:**

Material PAS +: rojo oscuro a magenta.

### **B. Compuestos PAS +**

- polisacáridos simples: como el glucógeno y la celulosa.
- Mucopolisacaridos neutros: se encuentran en el epitelio gástrico, en glándulas del duodeno y en cápsulas bacterianas, también en intestino y estómago.
- mucoproteínas como son algunas mucinas del tubo digestivo y del árbol respiratorio o bronquial, también la tiroglobulina que está en el tiroides y la hormona estimulante.
- Glucoproteínas del suero
- Glucolípidos: como los gangliósidos y cerebrosidos.

### **C. Compuestos PAS -**

Los mucopolisacaridos ácidos no pueden ser oxidados por el ácido periódico y por eso son PAS - (ya que no aparecen los grupos carbonilos)

### **D. Controles de la técnica del PAS.**

Es imprescindible realizar preparaciones testigo o de control que confirmen los resultados obtenidos, para ello suelen ser muy útiles las técnicas de bloqueo tales como las de bloqueo de grupos aldehídos en general y las de acetilación de grupos aldehídos situados en posición 1,2 glicol.

#### ***Técnica de bloqueo para aldehídos en general***

Se realiza tratando los grupos aldehído presentes en el tejido, tras la oxidación con ácido periódico con una solución de ácido acético saturado con Dimedona, entre 1-16 h. a 60 ° C.

Posteriormente se lava con agua destilada y se continúa con PAS normal.

Únicamente se teñirá el material PAS + formado a expensas de grupos aldehídos situados en posición 1,2 glicol (los que proceden de glúcidos).

### **Técnica de bloqueo mediante acetilación para grupos 1,2 glicol.**

Se basa en la negatividad de la reacción del PAS después de la acetilación de los grupos 1,2 glicol presentes en los hidratos de carbono.

Este proceso es total o parcialmente reversible por saponificación posterior mediante tratamiento con hidróxido potásico. Si no se ha realizado el bloqueo de los aldehídos preexistentes debe realizarse un control sin oxidar el tejido; todo lo coloreado en esta preparación no serán grupos 1,2 glicol oxidados, sino grupos aldehídos que ya estaban presentes antes de la oxidación.

Después se realiza el PAS oxidando y se compara los resultados de ambas preparaciones.

El 2º problema en la técnica del PAS se plantea cuando se trata de diferenciar si los grupos aldehídos aparecidos tras la oxidación lo han hecho sobre grupos alcohólicos situados en posición 1,2 glicol o si los oxidados han sido grupos hidroxiaminos primarios o hidroxiaminos secundarios, compuestos no presentes habitualmente en los hidratos de carbono que son PAS +.

Esta distinción puede realizarse mediante acetilación reversible y saponificación.

**Acetilar** consiste en introducir un grupo acetilo en un compuesto orgánico. El anhídrido acético es un reactivo que tiene gran aplicación para acetilar, de forma que con este reactivo se bloquean todos los grupos alcohólicos en general existentes en el tejido.

Este tipo de unión se llama **éster**.



**Saponificar** es romper un enlace tipo ester de forma que en condiciones idóneas reaparece el grupo químico que existía antes de la acetilación.

La acetilación es totalmente reversible tras saponificación para los grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol; totalmente irreversible para los grupos hidroxiaminos secundarios y moderadamente reversible para los hidroxiamino primarios.

### **Procedimiento técnico de acetilación - saponificación**

#### Soluciones:

- Mezcla para la acetilación:
- Anhídrido acético.....13 ml.
- Piridina anhidra..... 20 ml.
- mezcla para la saponificación
- Hidróxido potásico 1N en solución acuosa o en alcohol 80° C.

#### Modo de operar:

- Acetilación:
- Desparafinar e introducir los cortes en alcohol absoluto. Secarlos y pasarlos a la piridina.
- Tratar con la mezcla de acetilación de 37° - 58° C durante un tiempo que depende del material biológico y suele estar de 30 min. a 24 h.
- Pasamos los cortes a la piridina.
- Alcohol absoluto.
- Hidratar.
- Acetilación + saponificación:
- Se repite el proceso anterior.

- Tratar con la disolución de KOH durante 45 min.
- Enjuagar con agua.
- Lotes de preparaciones y resultados en los controles de la técnica del PAS.
- Una preparación a la que se le hace el PAS normal.
- Otra preparación del mismo corte. Se le hace un PAS sin oxidar para detectar grupos aldehídos ya existentes o bien se hace un método de bloqueo específico para dichos grupos.
- Un lote de cortes que llevan acetilación.
- Un lote de cortes que llevan acetilación + saponificación.

### **Resultados:**

- Al acetilar desaparecen todos los grupos PAS+ menos los aldehídos ya existentes.
- Al acetilar y saponificar los grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol quedan como estaban, recuperan la PAS positividad.
- Los hidroxiamino primarios reaparecen mucho más débilmente y los secundarios permanecen bloqueados al ser la acetilación irreversible.

### **Técnicas para determinar mucopolisacáridos ácidos.**

Los mucopolisacáridos ácidos son unos polisacáridos que no tienen grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol sino grupos ácidos carboxilos o sulfatados.

Las técnicas para determinar mucopolisacáridos ácidos son principalmente:

**a) Azul Alcian**

**b) Reacción Metacromática**

- **Técnica del Azul Alcían:** se ha comprobado que usando el azul alcían en condiciones de pH en torno a 2,4 -2,6 se colorean los mucopolisacáridos ácidos sulfatados y los carboxílicos.

Si por el contrario se emplea a un pH muy bajo, en torno a 1, sólo se colorea los mucopolisacáridos sulfatados, los carboxílicos no se tiñen.

Si se sigue disminuyendo el pH hasta 0,5 se incrementa la selectividad de la tinción y en este caso sólo se tiñen los mucopolisacáridos fuertemente sulfatados.

#### **Procedimiento Técnico:**

- Fijación: formol al 4%.
- Soluciones:
- Azul alcían a pH 2,5:
- Azul alcían (C.I. 74240) ..... 1 g.
- Ácido Acético 3%.....100 ml.
- Azul alcían a pH 1:
- Azul alcían.....1 g.
- HCl 0,1 N..... 100 ml.
- Azul alcían a pH 0,5:
- Azul alcían.....1 g.
- HCl 0,5 N.....100 ml.

Filtrar todas las soluciones antes de usar.

Las soluciones son estables durante 2 semanas aproximadamente, como colorante de contraste se puede usar una solución de Rojo nuclear al 1 %.

### **Modo de operar:**

- Desparafinar e hidratar.
- Tratar con la solución deseada de azul alcian durante 30 min.
- Si se usó la solución a pH 2,5, lavar con agua (d); si se usó cualquiera de los otros dos, secar sólo con papel de filtro.
- Contrastar si se desea con rojo nuclear.
- Deshidratar, aclarar y montar.

### **Resultados:**

Azul alcian a pH 2,5 los mucopolisacaridos ácidos (carboxilos y sulfatos) se tiñen de azul.

Azul alcian a pH 1 sólo se tiñen de azul los mucopolisacaridos ácidos sulfatados.

Azul alcian a pH 0,5 sólo se tiñen de azul los mucopolisacaridos ácidos fuertemente sulfatados.

### **Reacción Metacromática:**

La metacromasia indica un cambio de color cuando un colorante químicamente puro tiñe selectivamente una estructura tisular de color "diferente" al de la solución diluida de colorante; se dice que ha ocurrido una **reacción metacromática**.

La estructura responsable de este cambio se llama **cromotropa**.

Para distinguirla de las restantes que se tiñen normalmente (**ortocromáticas**)

Sustancias cromotropas son los mucopolisacaridos ácidos, ácidos nucleicos, lípidos de carácter ácido y partículas de sílice.

La reacción metacromática presenta grandes variaciones ante las más pequeñas modificaciones del medio donde reproduce, por lo tanto, la reacción metacromática es de difícil interpretación e incluso puede proporcionar resultados contradictorios.

### **AZUL DE TOLUIDINA (técnica de metacromasia que más se hace)**

- Fijación:

En el caso de los mucopolisacaridos ácidos pueden emplearse tejidos fijados con alcohol, Bouin alcohólico e incluso formol, pero deben evitarse los fijados con agentes oxidantes.

- Soluciones:

- Solución Tampón de ácido acético - acetato a pH 4,2:

- Acetato sódico.....2, 7 g.

H<sub>2</sub>O (d).....100 ml.

- Ácido acético 0,5 M.....1,1 ml

H<sub>2</sub>O (d).....100 ml.

Solución A.....30 ml.

Solución B.....90 ml.

- Solución a 0,2 % de azul de toluidina en la solución tamponada anterior.
- Solución acuosa al 4 % de molibdato amónico.

### **Procedimiento Técnico:**

- Desparafinar e hidratar.
- Teñir con azul de Toluidina.....2 - 5 min.

- Lavar en la solución tamponada.
- Tratar los cortes en la solución de molibdato.....10 min.
- Lavar con agua (d).
- Deshidratar, aclarar y montar.

### **Resultados:**

Elementos de carácter metacromático se van a ver de rojo a púrpura y el resto se va a ver azul.

Los baños en alcohol etílico inhiben la metacromasia por lo que deben realizarse preparaciones testigo.

Una 1ª preparación se observa tras su paso por el agua cética antes de fijar con molibdato. Esto tiene por objeto evaluar el efecto metacromático inmediato en fase inestable. A continuación, se sigue el procesamiento normal.

Otra preparación no se deshidrata y se monta en un medio acuoso para evitar el paso por alcohol etílico.

La última preparación se confecciona normalmente, es decir, deshidratando y montando por el método habitual.

Comparando las 3 preparaciones se puede seguir la evolución del efecto metacromático y la influencia del procesamiento histológico realizado sobre ellas.

También se deben realizar **controles de especificidad en la reacción metacromática**. Se usan para distinguir entre mucopolisacaridos ácidos carboxílicos y sulfatados.

Son principalmente de **2 tipos**:

- **Variación de pH:** consiste en realizar la tinción entorno a un pH de 3, 5. en este caso la mayoría de los mucopolisacáridos ácidos carboxílicos pierden su metacromasia mientras que los sulfatados la conservan.

Haremos 2 lotes: el 1º se tiñen a pH 4,5 y el 2º a 3,5.

Los mucopolisacáridos ácidos que siguen siendo metacromáticos en el 2º lote corresponden a mucopolisacáridos ácidos sulfatados ya que los carboxílicos pierden su metacromasia.

- **Metilación reversible:** consiste en tratar un grupo de cortes con una mezcla de alcohol metílico y ácido clorhídrico, con lo que se bloquean por metilación los grupos ácidos de los mucopolisacáridos ácidos.

Después se realiza metilación seguida de saponificación, reapareciendo la metacromasia solamente en los mucopolisacáridos ácidos carboxílicos.

**Técnica para diferenciar mucopolisacáridos ácidos, neutros y glicoproteínas.**

**Técnica del azul ALCIAN - PAS.**

**Procedimiento Técnico:**

- Fijación: formol al 4 %.
- Soluciones:
- Solución azul alcian a pH 2,5.
- Solución ácido periódico el 0,5 %.
- Reactivo de Schiff.
- Solución de ácido sulfuroso.
- Colorante de contraste.

### **Técnica:**

- Desparafinar e hidratar.
- Solución azul alcian a pH 2,5..... 30 min.
- Lavar con agua (d)
- Ácido periódico.....10 min.
- Lavar con agua (d).
- Reactivo de Schiff ..... 15 - 30 min.
- Aclarar con 3 baños de agua sulfurosa.....2 min. Cada uno.
- Lavar con agua corriente ..... 5 min.
- Colorante de contraste (Hematoxilina Harris normalmente).
- Lavar, clorar y montar.

### **Resultados:**

Mucopolisacaridos ácidos: azul

Mucopolisacaridos neutros y glicoproteínas: rojo o rosa.

Resto: violeta (si se usa hematoxilina). **(García R. , 1987, págs. 225-232)**

La bioquímica del antígeno específico de próstata (AEP) y sus fracciones: el antígeno específico de próstata (AEP) es una kallicreína que está entre los varios tipos de sustancias que secreta la próstata en su función como glándula accesoria de la reproducción. En el semen actúa como una proteasa con preferencia desnaturalizante sobre las semenogelinas, las proteínas procoagulantes del semen producidas en la vesícula seminal, pero que como cualquier proteasa tiene un potencial adicional para metabolizar cualquier proteína. Es por esa acción destructora que la naturaleza toma todas las precauciones para que el AEP proteasa tenga un período de actividad efímero y una serie de fracciones clivadas o desactivadas que explican en su conjunto los



porcentajes en plasma del antígeno total y libre en el paciente normal y con patologías. El AEP puede dividirse de una manera simple en dos tipos básicos: activo e inactivo, o bien libre y complejo. Hacia el futuro puede esperarse que el uso del AEP como marcador de cáncer pueda refinarse en sensibilidad y especificidad con el uso de fracciones que se relacionen matemáticamente y además con el uso de otros tipos de antígenos como el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, *prostate specific membrane antigen*) y el antígeno de células madre de próstata (PSCA, *prostate stem cell antigen*).

Antígeno específico de próstata: La kalicleína 3, más conocida como antígeno específico de próstata, es una glicoproteína de cadena simple con un peso molecular de 33.000 daltons y 237 aminoácidos que se comporta como una enzima proteolítica producida además de las células epiteliales (glandulares) de la próstata, en las glándulas perianales, parauretrales, sudoríparas, tiroides, placenta, mama y endometrio, y también se encuentra en la leche materna. Su función primaria es la licuefacción del semen, antagonizando la acción de la semenogelina, también llamada “antígeno específico vehiculo-seminal”, que es la proteína que produce la coagulación del semen para proteger los espermatozoides durante la eyaculación.

Debe entenderse que la función proteolítica es preferente sobre la de la semenogelina pero no exclusiva, por lo que el organismo toma todas las precauciones para controlar adecuadamente esta enzima destructora de proteínas. **(Uribe , 2008, págs. 153-163)**

### **Recolección de indicios y/o evidencia físicos**

Para estudios de identificación y cotejo de vestigios biológicos (semen/espermatozoides, saliva, sangre, ADN)

Para la recolección y envío al laboratorio de muestras tomadas durante el examen, el perito médico deberá tomar en cuenta lo siguiente:

Cuando se practica el examen con espéculo y se toman muestras del cérvix en las primeras 72 horas de ocurrido el hecho, son más altas las probabilidades de encontrar espermatozoides.

En cuello uterino se ha podido recuperar espermatozoides no móviles de 5 a 7 días después de ocurrido el hecho y hasta 24 horas más tarde en la boca y en el recto.

En los frotis vaginales, si las muestras se tomaron después de 48 horas de ocurrido el hecho, es muy poco probable que se obtenga un resultado positivo. Lo mismo aplica en el frotis ano rectal, después de 24 horas y en el de la boca, después de 6 horas.

#### Reglas generales para la colecta de muestras con fines forenses

La colecta de muestras con fines forenses, debe realizarse de acuerdo a lo dispuesto en el manual de cadena de custodia. Específicamente, en los casos de delitos sexuales, el perito médico deberá prestar atención a lo siguiente:

Cuando disponga del “kit de asalto sexual”, deberá utilizarlo de acuerdo a las indicaciones contenidas en el mismo.

Evitar la contaminación: usar guantes y cambiarse para cada toma.

Recolectar las muestras lo antes posible, de esta forma se previene la pérdida de elementos importantes para la realización o interpretación de la prueba.

Asegurarse de que las muestras sean empacadas, almacenadas y transportadas correctamente (esto es responsabilidad del médico), según lo establecido en el manual de cadena de custodia.

Consultar con el laboratorio de ser necesario, para requerimientos especiales de manejo y almacenaje. Como regla general los fluidos deben ser refrigerados, cualquier otro elemento se deberá mantener seco.

Rotulación apropiada: todas las muestras deben ser rotuladas con los datos de la persona evaluada, tipo de muestra, fecha y hora de la colecta.

Garantizar la seguridad: las muestras o indicios se deben empacar de manera segura y a prueba de sabotaje o vulneración.

Mantener la continuidad: una vez colectada la muestra, se debe registrar su manejo subsecuente mediante el formato de cadena de custodia. Las

muestras se deben separar según el laboratorio al que serán enviadas conforme a los lineamientos del manual de cadena de custodia.

Documentar la colecta en el dictamen pericial.

Reglas generales para la colecta de muestras mediante hisopado

Utilizar hisopos adecuados.

Humedecer los hisopos con agua estéril o solución salina normal para la colecta de material de superficies secas (piel, ano, etc.)

Todos los hisopos se deben secar al aire antes de su embalaje y transporte (colocar en bolsa de papel o cajetita para hisopos).

Realizar al menos dos hisopados de cada región anatómica.

Muestras en piel, cavidad oral y uñas

Relato de hechos recientes (primeras 72 horas de ocurrido el hecho) con o sin hallazgos físicos si se sospecha la presencia de material biológico.

Para piel colectar con hisopo humedecido si se busca semen, saliva (áreas de sugilaciones o posibles huellas de mordedura), para material foráneo como fibras, pelos, vegetación, se puede utilizar un hisopo o pinzas sin dientes. Embalar en una bolsa de papel previo secado. Se puede utilizar una lámpara de luz forense para orientar los sitios anatómicos que pueden presentar posibles manchas de material biológico (semen).

Para la cavidad oral, utilizar un hisopo en los surcos mucogingivales y carrillos; utilizar hilo dental, sin cera, para los espacios interdentes.

Para uñas utilizar un cortaúñas estéril o tijera, de no ser posible, lavar el material ya utilizado con cloro, agua y luego alcohol para eliminar los restos de material biológico. En caso de no contar con corta uñas ni tijera se puede utilizar un palillo de diente o el extremo opuesto de un hisopo para colectar el material biológico que puede encontrarse en el lecho subungueal.

### **Muestras vulvares**

Relatos de hechos recientes, con o sin hallazgos físicos, utilizar hisopos humedecidos.

### **Muestras vaginales**

Relato de hechos recientes (primeras 72 horas) con hallazgos que ameritan, a criterio del perito médico, la toma de muestras.

**Tomar hisopado** (hisopo seco) ciego en fondo de saco vaginal (también se puede realizar lavado con 10 ml de SSN y colectar el fluido obtenido) y embalar en bolsa de papel.

### **Muestras de ano/recto**

Relato reciente de los hechos con o sin hallazgos físicos. Utilizar hisopos humedecidos en solución salina normal.

Tomar muestra de sangre de referencia (indubitada) de la víctima para cotejo con el agresor, preferiblemente en tubo con preservante (EDTA) al menos 5 ml y refrigerar.

### **Muestra de pelos**

Tomar muestra de pelos de referencia de la víctima (muestra indubitada) para cotejo en caso de que en el peinado púbico o prendas de vestir se encuentren pelos para cotejo. Se recomienda arrancar cinco pelos por cada área del cuero cabelludo, y por cada segmento corporal, los cuales deben embalsarse por separado según el área de la cual fueron extraídos. **(Instituto de medicina legal y ciencia forense P. , 2011)**

### **La práctica de la histoquímica**

La histoquímica se puede definir como la química de los tejidos y la citoquímica como la química de las células. En la práctica, para evitar el uso de dos palabras, uno será suficiente, la palabra histoquímica puede usarse para cubrir las propiedades de ambos material celular y extracelular. Si aceptamos que estas propiedades son tanto estructurales como funcionales, entonces la histoquímica puede extenderse para cubrir asuntos generalmente considerados como la provincia de los fisiólogos. Desde el punto de vista del histólogo y patólogo, sin embargo, es necesario contratar este concepto más amplio y reintroducir uno restringido. En este sentido restringido, la histoquímica es la investigación de componentes tisulares aplicando a preparaciones microscópicas métodos de análisis físicos y químicos que no dañen los tejidos

en tales una manera de hacerlos irreconocibles. Dichos métodos deberían estar dentro de la brújula de todos los histólogos. Solo se incluyen los métodos que entran ampliamente dentro de este alcance en la revisión de los métodos modernos de histoquímica que sigue. La mayoría puede ser aplicada por el histólogo a los tejidos que está acostumbrado a estudiar, sujeto solo a la preparación adecuada del material. Pocos pueden describirse como fáciles, si "fácil" significa sin problemas, pero las buenas tinciones histológicas rara vez son raras logrado sin un esfuerzo considerable.

En uno o dos campos particulares, los avances logrados mediante el uso de nuevos métodos durante los últimos diez años han sido espectaculares. En otros, el uso de métodos más antiguos ha continuado, a menudo con una interpretación mejorada, como resultado del uso de varias pruebas paralelas en lugar de una sola. Este principio siempre se debe observar cuando la naturaleza de cualquier material en particular está bajo investigación. Tanto los avances recientes y algunos de los métodos más antiguos serán mencionados en esta revisión, y serán tratado ampliamente bajo los títulos de los diversos compuestos o grupo de compuestos a lo que se refieren. Los problemas de fijación y los métodos para demostrar enzimas, serán consideradas en secciones separadas.

**(Pearse, 1951)**

Estudios recientes han demostrado que, al menos en algunas especies, la inmunización activa de la hembra con testículos homólogos o espermatozoides produce una reducción de la fertilidad. Isojima, Graham, y Graham inyectaron tejido de testículo homólogo adulto en conejillos de indias hembras y encontraron que su fertilidad se redujo significativamente. Anticuerpos circulantes contra tejido testicular y esperma también podrían ser demostrados en los animales inyectados. Katsh mostró que la inyección de esperma homólogo redujo la fertilidad de la hembra conejilla de indias. Los experimentos de inmunización en el conejo con plasma seminal han dado resultados algo diferentes. Weil y Roberts no pudieron demostrar una reducción fertilidad en conejas hembras después de la inyección de plasma seminal homólogo. Menge y Protzman informaron que el antisuero de cobaya contra el

conejo seminal el plasma no evitó que los espermatozoides fertilizaran los óvulos en el conejo. Inmunización los estudios con semen humano en humanos son escasos. Li y Behrman informaron recientemente que los anticuerpos de conejo contra el ser humano seminal plasma fueron capaces de inmovilizar esperma humano. Este hallazgo que humano seminal el plasma puede contener antígenos antifertilidad es de gran interés y puede tener implicaciones para el futuro. Es de esperar que conduzca al desarrollo de inmunológicos métodos para el control de la fertilidad, y puede proporcionar un nuevo enfoque para el estudio de hasta ahora infertilidad inexplicada en las mujeres.

El plasma humano seminal (HSP) es conocido por ser altamente antigénico. Shulman y Bronson sugirió una clasificación inmunolectroforética del HSP.

Antígenos, y recientemente Li y Shulman los han clasificado de manera similar en cinco principales grupos, A, B, C, E y F. Ninguno de estos componentes ha sido estudiado en gran detalle. El presente estudio trata de la purificación y caracterización de El antígeno de HSP, que es de particular interés porque es altamente componente antigénico principal, inmunogénico, específico de HSP del ser humano seminal plasma. **(Li & Beling, 1973)**

En 1970, Li y Behrman informaron que el antisuero de conejo contra humanos plasma seminal (HSP) es capaz de inmovilizar y aglutinar humanos esperma. Este hallazgo es de gran interés en vista de la posibilidad de utilizar antígenos componentes aislados de HSP para el control inmunológico de la fertilidad mediante la producción anticuerpos inmovilizadores de esperma o esperma glutinantes en la mujer.

Li y Shulman clasificaron los antígenos HSP por inmunolectroforesis en cinco grupos principales con los nombres en clave de A, B, C, E y F. Señalaron que el antígeno ÉI es de particular interés debido a su probada especificidad HSP y su presencia infalible en todos los especímenes examinados de HSP.

Posteriormente, Li y Beling obtuvieron antígenos E1 y E2 altamente purificados de

HSP mediante una serie de procedimientos de purificación cromatográfica en columna tales como DEAE-celulosa, Bio-Gel A-0.5m, Sephadex G-100 y Bio-

Gel A-1.5m. La Fracción Purificada final consistió predominantemente en el antígeno E1 (86%) con pequeña cantidad de antígeno E2 (14%). La pureza de los antígenos se demostró mediante inmunolectroforesis, inmunodifusión y membrana de acetato de celulosa electroforesis. El antígeno se caracterizó como una proteína con un peso de aproximadamente 31,000 y con alta velocidad de difusión en medio de agar. El coeficiente de sedimentación fue de aproximadamente 2.3 S en ultracentrifugación estudios.<sup>4</sup> El antígeno E2, que también es específico de HSP, demostró tener propiedades similares a los del antígeno E1 en muchos aspectos, como el peso molecular, movilidad electroforética y velocidad de difusión. Fue técnicamente difícil, por lo tanto, para separar los antígenos E1 y E2. El presente informe trata de más caracterización de los antígenos E1 y E2 particularmente con respecto a la posibilidad de usar estos antígenos para propósitos de antifertilidad. **(Li & Beling, 1974)**

El impacto del microscopio de luz en las teorías de la vida y otros hallazgos de Leeuwenhoek: El desarrollo del microscopio contribuyó a los argumentos intelectuales del siglo XVII en relación a los orígenes de la vida. La teoría de la preformación suponía que el embrión estaba ya perfectamente formado en miniatura y solamente requería nutrición para su crecimiento. Marcello Malpighi (1628-1694) y Jan Swammerdam (1637-1680) fueron 'ovistas', creían que el huevo femenino contenía embriones preformados<sup>9</sup>. Algunos ovistas también creían en el concepto de "embôitement": es decir que todas las generaciones de hombres y mujeres estaban ya contenidos en los "huevos" de Eva y que la raza humana terminaría cuando fuera fertilizado el último huevo. Leeuwenhoek y otro observador holandés, Nicho-las Hartsoeker (1656-1725) eran 'animaculistas' y describieron a los espermatozoides conteniendo a humanos perfectamente formados pero que igualmente necesitaban penetrar el huevo para su maduración.

Leeuwenhoek, en sus cartas a la Real Sociedad, escribió: "les ruego, por lo tanto, y a aquellos caballeros a los que esta información pueda interesar, por favor tener en mente que mis observaciones son el resultado solamente de mis impulsos sin ayuda y de mi curiosidad..." Así, por ejemplo, en su carta número

18 a la Sociedad (octubre 9 de 1676) y que constituye el primer trabajo escrito en Bacteriología: "los animáculos que he llamado animáculos ovalados no son realmente ovalados, a menos que se miren en el dorso o la parte superior del cuerpo, ahora he demostrado sus pequeñas patas, pero también su cabeza y su corta y puntuda cola. Es maravilloso ver la perfección de esta pequeña criatura. Debo decir, por mi parte, que jamás he tenido antes mis ojos una visión tan placentera como estos miles de criaturas vivas, todas ellas vivas en una gota de agua, moviéndose una a través de la otra y cada criatura demostrando su propia movilidad".

Leeuwenhoek también estudió su propio semen, raspados de su propia mucosa bucal y del sarro dental y sus propias heces. En carta del 31 de mayo de 1678 detalló la estructura de pelos de su barba, sus manos, fosas nasales, pestañas y cejas. Acerca de sus propias heces escribió: "decidí estudiar en alguna oportunidad que mi excremento era muy delgado y pude notar la comida que había ingerido, qué líquido había bebido y vi además que todas esas partículas de lo que había comido estaban en un agua transparente en la cual vi moverse animáculos en forma muy especial y hermosa".

Al estudiar el contenido de su propia mucosa bucal señaló en forma magistral y amena: "Por mi parte, puedo juzgar por mi propio caso, que, aunque limpio mi boca todos los días de la manera ya mencionada, que no hay más personas en nuestra Unión de Países Bajos, como el número de animales vivientes que llevo en mi propia boca cada día".

Describió, asimismo, la circulación de la capa cortical cerebral, la estructura del cristalino de los ojos, los bastones de la retina, las fibras del tejido conectivo y epitelio corneal y la apariencia estría-da de los músculos. A la vez demostró que el tejido nervioso "consistía de hebras diversas, muy pequeñas, que yacen unas con otras". En los extremos de los nervios, pequeños túbulos, presumiblemente vainas de mielina. A los 85 años escribió una carta describiendo cómo con una navaja había tomado muestras de su piel y había visto "poros".



Es increíble que todos estos hallazgos los haya hecho un simple comerciante en linos, sin educación universitaria formal, sin conocimiento del latín, cuyo pasatiempo era la ciencia y que supo hacer microscopios pero que fundamentalmente estaba embebido de curiosidad y entusiasmo. Incluso en el momento de morir, le pidió a su amigo, el Dr. Jan Hoogvliet, que tradujera unas cartas al latín para enviarlas sin demora a la Real Sociedad de Londres. **(Miranda, 2009, págs. 567-574)**

### **Antígeno específico de próstata**

El PSA es considerado un marcador tumoral del cáncer de próstata. Es producido por las células cancerosas del tejido prostático y secretado hacia la sangre en cantidades proporcionales a la magnitud y localización del tumor, por lo que constituye una valiosa herramienta en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. No obstante, el PSA se expresa normalmente en el tejido prostático, aunque a niveles basales (0,4 - 3 ng/mL), por lo que no constituye un marcador específico del tumor. Otras patologías de la próstata como son la hiperplasia benigna de próstata (*BPH*, siglas en inglés) y la prostatitis, también producen aumentos en las concentraciones de PSA por encima del valor basal.

También se ha descrito la producción de cantidades concomitantes de PSA en varios tejidos extra-prostáticos como son el páncreas, las mamas, las glándulas salivares y periuretrales, así como en los tejidos neoplásicos de pulmón, ovario, páncreas y mamas.

No obstante, debido al pequeño aporte (decenas de pg/mL) de estos tejidos al contenido total del antígeno en suero, no se ve afectada la utilidad clínica del PSA en el diagnóstico del CP.

#### **Características bioquímicas del PSA**

El antígeno específico de próstata es una glicoproteína (8% de glicosilación) de 237 aminoácidos (aa), y aproximadamente 34 kilodaltons (kDa), que pertenece a la familia enzimática de las serín-proteasas. Está constituida por una sola cadena polipeptídica.

Presenta de tres a cinco isómeros con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 6,8 y 7,5. Estos isómeros se diferencian entre sí en su composición

sacarídica. Se desconoce el papel biológico y la relación de los isómeros del PSA con el desarrollo y evolución del CP.

El PSA humano es codificado por un gen localizado en el cromosoma 19, donde también se encuentran los genes de otras dos proteínas de la familia de las calicreínas, la calicreína pancreática humana (hK1) y la calicreína prostática humana (hK2), con las que presenta una homología aminoacídica del 60% y 80%, respectivamente. El gen que codifica para el PSA se clonó en 1989<sup>27</sup>

#### Producción, secreción y función del PSA

El PSA es producido en su mayoría en la región glandular de la próstata, específicamente por las células lumbales secretoras, y en menor medida, por las células neuroendocrinas. Es sintetizado en el retículo endoplasmático y liberado por exocitosis a los conductos exocrinos de la glándula, desde donde pasa a formar parte del fluido prostático que aporta el 15% del volumen total del semen. La concentración de esta proteína en el semen de sujetos sanos varía entre 0,4-3 mg/mL y se conoce que aproximadamente un 70% de la proteína es enzimáticamente activa. En condiciones fisiológicas normales una pequeña cantidad del PSA escapa a la circulación sanguínea, donde alcanza una concentración generalmente inferior a 4 ng/mL<sup>33</sup>. Su función biológica es contribuir a la licuefacción del semen mediante la degradación del coágulo seminal, compuesto mayoritariamente por las proteínas semenogelina 1 y 2, aumentando la movilidad de los espermatozoides. También se ha descrito su participación en la inactivación de la proteína de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP-3, siglas en inglés) y su posible papel en la estimulación del crecimiento tumoral. **(Acevedo, 2012, págs. 15-17)**

## **Fijación de Muestras Biológicas**

### **Fijadores Químicos**

Los métodos químicos de fijación ofrecen los mejores resultados. Estos métodos utilizan líquidos que difunden hacia la profundidad de la muestra para alcanzar y desnaturalizar las enzimas que provocan la autólisis tisular. Los reactivos utilizados tienen capacidad de interactuar con los componentes del

tejido, tales como proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, lípidos, glicolípidos, lipoproteínas, pigmentos, ácidos pécticos y nucleicos; como así también, la capacidad de preservar la composición y localización de carbohidratos: celulosa y almidón en vegetales, quitina en insectos o glucógeno en tejidos animales y depósitos metálicos ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{As}^{-3}$ ,  $\text{Cr}^{+2}$ ). La fijación química involucra el uso de soluciones orgánicas e inorgánicas que permiten la adecuada preservación de la morfología tisular y propiedades tintoriales de las macromoléculas del tejido. Estas soluciones se dividen en dos grandes grupos:

1. **Fijadores Coagulantes:** son soluciones que pueden coagular proteínas, transformándolas en estructuras insolubles. Debido a que la arquitectura del tejido se mantiene fundamentalmente por lipoproteínas (uno de los principales componentes de membranas plasmáticas), por proteínas fibrosas (colágeno) y globulares (nucleoproteínas), la coagulación de estas proteínas mantiene la morfología del tejido a nivel de microscopía de luz, si bien la fijación por coagulación produce floculación citoplasmática, como así también, preservación pobre de mitocondrias y gránulos de secreción.
2. **Fijadores No Coagulantes:** estas soluciones interaccionan con diferentes sitios químicos de las macromoléculas tisulares para establecer, a modo de puente, uniones que originan una malla que las entrelaza. A diferencia de los fijadores coagulantes, la eliminación de las moléculas de agua a partir del tejido es mucho menor, haciendo que la mayoría de los componentes tisulares se conserve adecuadamente. De esta manera y de acuerdo a los efectos que se desencadenan en el tejido, la fijación se produce por deshidratación, reticulación, formación de sales o por cambio de estado coloidal:

### **Fijación por Deshidratación**

Los reactivos fijadores que se describen a continuación, presentan gran compatibilidad química con las moléculas de agua, vía puentes hidrógeno. Los lípidos se disuelven rápidamente, a excepción de los fosfolípidos; mientras que los carbohidratos permanecen conservados dependiendo de la precipitación proteica. Los ácidos nucleicos se fijan correctamente.

**Etanol:** también llamado alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ) es un fijador coagulante, no aditivo y de bajo potencial de ionización (0.45 volt.), suele emplearse solo. Penetra lentamente el tejido produciendo contracción de la muestra y endureciéndola. Es miscible en agua en todas sus proporciones y compatible con todos aquellos fijadores que no tienen actividad oxidante fuerte. No produce efectos de sobre coloración. Provoca la precipitación de las proteínas por extracción de la capa de agua que las solventa pero sin desnaturalizarlas. La acción más potente corresponde a las soluciones más concentradas (96° o 100°). Para fijar fragmentos de 5 mm de espesor es suficiente con 6 horas de acción. Si el tamaño de la muestra es mayor se corre el riesgo de que las capas superficiales se endurezcan demasiado y éste no pueda penetrar aún más como para alcanzar las capas más profundas. Las soluciones etanólicas menos concentradas tienen un efecto macerador de la muestra (70°), por tanto, no se utilizan como fijador. Precipita por coagulación la totalidad del citoplasma, las mitocondrias se distorsionan, los glóbulos lipídicos difunden o disuelven y provoca ligera contracción nucleolar.

**Metanol:** conocido como alcohol metílico ( $CH_3OH$ ) es un fijador no aditivo que, generalmente, se utiliza solo y cuyo potencial de oxidación es inferior al del etanol. Esto hace que tenga mayor poder reductor y, por tanto, se lo recomienda para la fijación de ácidos nucleicos y en la impregnación argéntica de regiones organizadoras del nucléolo. Es un excelente fijador para citología exfoliativa general. Al igual que el etanol es miscible en agua y forma puentes hidrógeno con las moléculas de agua del tejido, las que extrae con rapidez coagulando proteínas. Es muy adecuado para la realización de métodos enzima e inmunohistoquímicos e hibridación in situ.

**Acetona:** es un agente no aditivo y muy oxidante (0.65 volt.), debido a que el átomo de oxígeno puede compartir coordinadamente un par de electrones. Su fórmula es  $CH_3COCH_3$  y deshidrata violentamente. Es miscible en agua e incompatible con fijadores metálicos bivalentes. Generalmente se la emplea sola. Es recomendada para ácidos nucleicos y en protocolos de inmunofluorescencia directa para la detección de complejos autoinmunes (biopsia renal, hepática, piel o mucosa). También se la puede emplear en

determinados estudios con microscopio electrónico de transmisión. Al igual que los anteriores, disuelve los lípidos y los carbohidratos quedan conservados debido a la correcta precipitación de las proteínas. Sin embargo, la rápida extracción del agua desde el tejido provoca una contracción nuclear, que deja un halo perinuclear, especialmente, en los epitelios. (Tomasi, 2008)

El papel de la sección de bioquímica en la investigación por agresión sexual en COSTA RICA: Dentro del grupo de delitos ejecutados con violencia sobre las personas, los de agresión sexual son de los que provocan más consecuencias en las víctimas, ya que el daño abarca una serie de factores que van desde lo físico hasta lo psicológico. Siendo que las más afectadas son las mujeres, Lorente incluye este delito entre lo que describe como el “Síndrome de Agresión a la Mujer”, compuesto por la violación en el medio social, el maltrato en el medio familiar y el acoso sexual en el medio laboral. Es decir, los tres ámbitos principales en los que se desarrolla la persona.

En el país la legislación vigente clasifica los delitos por agresión sexual, principalmente en seis tipos diferentes: violación, relaciones sexuales con personas menores de edad (estupro), abusos deshonestos, contagio venéreo, corrupción y proxenetismo.

Cuando se presenta un delito sexual se debe desarrollar una serie de investigaciones que incluyen entre otros elementos, aspectos policiales, psicológicos y científicos. Es precisamente en este último aspecto en el que la Sección de Bioquímica del Laboratorio Forense cumple su función, llevando a cabo la búsqueda de fluidos corporales humanos (principalmente semen, sangre y saliva) en diversos indicios, así como la comparación de perfiles de ADN, el tamizaje de enfermedades de transmisión sexual y pruebas de embarazo en las ofendidas.

Este trabajo tiene por objetivo presentar a los empleados judiciales, una descripción general de los diversos tipos de pericias, que se llevan a cabo en la Sección de Bioquímica, en lo que concierne a Delitos Sexuales, además de indicar cuáles son los indicios que se necesitan para realizarlas.

## **DENUNCIA Y VALORACIÓN MÉDICA DE LA VÍCTIMA**

El principio de Locard describe la transferencia de elementos del agresor a la víctima, de la víctima al agresor, y de ambos al lugar donde ocurren los hechos. Este principio es aplicable a la agresión sexual, donde entre otros elementos, ocurre la transferencia de fluidos biológicos. A partir de ese momento, por efecto de dilución y de la acción de los microorganismos presentes en las superficies corporales, la concentración de estos fluidos empieza a disminuir hasta llegar a niveles en los que no son detectables. Por eso, las víctimas de agresión sexual deben interponer la denuncia en la Fiscalía o Delegación del OIJ más cercana y ser remitidas al médico forense lo más pronto posible, para que este realice la valoración correspondiente. Durante el examen el médico forense recolecta muestras de sitios anatómicos en los que sospecha la presencia de semen. Para esto, normalmente utiliza cuatro aplicadores, indicando en ellos el nombre de la víctima, sitio anatómico muestreado, fecha y hora de toma de la muestra. Adicionalmente, puede tomar muestras para la investigación de contagio venéreo por gonorrea y Chlamydia.

En casos en los que se sospeche de la presencia de semen en la cavidad vaginal y no sea posible llevar a la víctima de forma inmediata al médico forense, lo más recomendable es que, en el mismo momento en que la víctima presente la denuncia, se le pida que entregue la prenda íntima que lleva puesta y se le entregue una nueva prenda con un protector diario, el cual debe utilizar hasta el momento de la valoración médica. Durante este tiempo, el protector diario funciona como un recolector que concentra tanto los flujos provenientes de la víctima, como el semen que pudiera estar presente en ellos. De este modo, se mantienen buenas probabilidades de detectar semen del agresor, a pesar de que la muestra no se tomara de forma inmediata.

Por otra parte, la Fiscalía a cargo de la investigación, recolecta evidencias en el sitio en el que ocurrió el ataque, así como las prendas que vestía la víctima o el protector diario que se le proporcionó al momento de la interposición de la denuncia. Para garantizar la identidad de los indicios, y la preservación de los fluidos biológicos que pudieran estar presentes en ellos,

es necesario que, luego de ser recolectados, los indicios sean debidamente embalados, es decir, empacados secos en bolsas de papel, de forma individual, lacrados, identificados con la información básica del caso y con la cadena de custodia completa.

Labores de la sección de bioquímica

## **1. INVESTIGACIÓN POR SEMEN**

Tanto en las muestras obtenidas de los diferentes sitios anatómicos por el médico forense, como en los indicios enviados por la Fiscalía, el fluido seminal presente debe extraerse y concentrarse en una preparación que permita el análisis mediante las siguientes técnicas de laboratorio: búsqueda de espermatozoides por tinción de Christmas tree (CT), determinación de Fosfatasa Ácida (FA) y determinación de Proteína p. 30.

Mientras que, en el caso de aplicadores tomados de sitios anatómicos, este extracto se prepara directamente, en el caso de los indicios, se prepara a partir de presuntas manchas de semen detectadas mediante la prueba de Brentamina o Mapeo, en la cual, como resultado de la interacción del reactivo con la fosfatasa ácida presente en el fluido seminal, se genera un producto de color.

### **Búsqueda de espermatozoides por tinción de Christmas tree (CT)**

El elemento característico del semen es el espermatozoide, el cual se encuentra exclusivamente en el tracto genital masculino y cuya finalidad es la reproducción. Fue visto al microscopio por primera vez por Van Leeuwenhoek en 1678. La anatomía del espermatozoide consta de una cabeza, un cuello y una cola larga, en relación con el tamaño de la cabeza.

En esta tinción específica para espermatozoides, las cabezas de los mismos se observan de color rojo y las colas de color verde, por lo que es conocida como tinción de "Christmas tree". La muestra teñida es observada al microscopio escrupulosamente, buscando y cuantificando los espermatozoides presentes. Por la naturaleza de la muestra con que se cuenta y el tratamiento que se le da en la preparación de los extractos, es posible observar morfologías atípicas tales como la ausencia de cola, razón por la cual es necesario que

peritos debidamente formados y con experiencia sean los que realicen este tipo de análisis.

El tiempo de permanencia de los espermatozoides en la cavidad vaginal cambia dependiendo de, entre otras variables, si la ofendida se encontraba con la menstruación o con infecciones vaginales, el pH vaginal, el lavado vaginal, el ejercicio físico y la cantidad de espermatozoides en el eyaculado. Por su parte factores como la defecación, afectan el tiempo de permanencia de los espermatozoides en la cavidad anal. La mezcla de estas variables hace que en general, los espermatozoides puedan detectarse en vagina hasta tres días después del coito. Sin embargo, en la literatura relacionada con la investigación forense, se han observado algunos casos en los cuales los espermatozoides han sido detectados hasta seis días después del coito.

La presencia de una cantidad adecuada de espermatozoides en la muestra, posibilita la extracción del material genético contenido en sus cabezas, de modo que se obtenga suficiente ADN como para realizar comparaciones con muestras provenientes de sospechosos, con lo cual eventualmente se puede establecer el origen de los espermatozoides encontrados. Para realizar dicha comparación es necesario contar con muestra de sangre de los posibles imputados, por lo que se le informa a la Autoridad Judicial correspondiente, para que remita a las partes involucradas en la investigación. Por otra parte, no encontrar espermatozoides en los extractos puede deberse a la ausencia de semen en la muestra analizada, o bien a la presencia de eyaculados provenientes de pacientes azoospermicos (que carecen de espermatozoides en el fluido seminal), en los cuales la detección de elementos como fosfatasa ácida o proteína p30 son los indicadores de la presencia de semen. **(Cerdas , López, & Espinoza, 2005, págs. 133-138)**

## **MUC-1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN**

Las mucinas son una familia de proteínas de elevado peso molecular (250-500 kDa) que están altamente glicosiladas y que se encuentran presentes en la superficie de los epitelios formando el glicocálix, aunque en ocasiones se encuentran en células no epiteliales como células tumorales y células



germinales. Poseen una estructura no globular, por sus abundantes residuos de prolina, alanina y glicina; y está altamente o-glicosilada, sobre todo en sus cuantiosos residuos de treonina y serina. Los oligosacáridos que se le unen se componen de N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, galactosa, fructosa y ácido siálico. Contienen un importante número de repeticiones en tándem que varían en número y la longitud de la unidad de repetición según la mucina, aunque también existen diferencias entre individuos en el número de repeticiones.

MUC-1 en concreto, está en el cromosoma 1 (1q21), posee 7 exones, pero su tamaño varía de 4 a 7 kb dependiendo del número de repeticiones en tándem que posea el exón 2.

Esta proteína consta de tres partes bien diferenciadas: el amino terminal que posee una secuencia señal hidrofóbica de 13 aminoácidos, detrás de otra de 7 y delante de repeticiones en tándem degeneradas; una región central formada por las repeticiones en tándem de aminoácidos bien conservados (20 aminoácidos de 21a 125 veces) y la región carboxilo terminal que posee repeticiones en tándem degeneradas, la secuencia transmembrana y la cola citoplasmática, que puede estar fosforilada y que se asocia al citoesqueleto.

Es una proteína importantemente o-glicosilada, sobre todo en las repeticiones en tándem, ya que posee gran cantidad de serinas y treoninas. Dichas cadenas de azúcares proceden del aparato de Golgi y podrían representar hasta un 50% del peso total.

Además de todo esto, encontramos distintas isoformas de la mucina MUC-1, que se pueden explicar por dos mecanismos diferentes: el primero sería por la existencia de un sitio de corte para alguna proteasa, en una región extracelular próxima a la membrana. Este corte se produciría en el retículo endoplasmático, pero no se produce proteína secretada porque se establecerían uniones no covalentes entre ambos fragmentos que impedirían la secreción como forma libre.

Esta es la forma mayoritaria, y las otras isoformas se producirían por splicing alternativo, entre intrón 2 y exón 3, que podría sufrir el mRNA y que generaría dos péptidos, uno que sería secretado (MUC-1/SEC) (Hey et al.,

2003), por carecer del dominio transmembrana, que actuaría como ligando, y otro que quedaría en la membrana (MUC-1/Y), que carecería de las repeticiones en tándem y del amino terminal, actuando como receptor de membrana del anterior.

Dicha mucina sobresale unos 200-500 nm de la superficie de las células, mientras que las proteínas típicas del glicocálix apenas alcanzan los 10 nm que parece indicar que juegan un papel en fenómenos de antiadhesión entre glicoproteínas de células próximas. Haciendo referencia a este hecho se ha visto, a través de delecciones, que las mucinas han de sobresalir de la superficie celular al menos entre 50 y 200 nm para ejercer su función correctamente

(Figura 14).

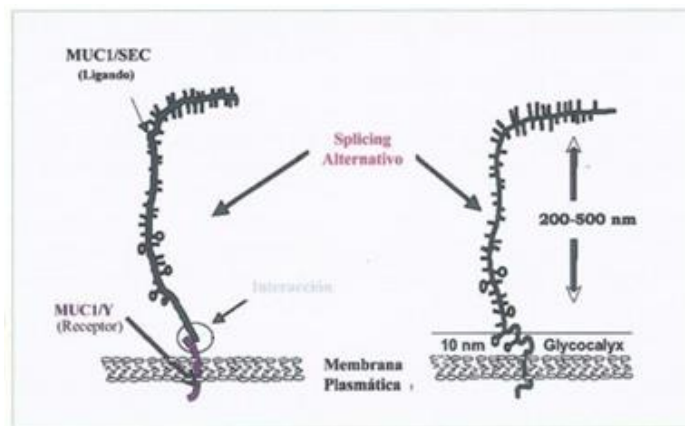


Figura 15. Representación estructural de la Isoformas MUC1

Fuente: Asociación para el estudio de la biología de la reproducción. Martínez, J., Conejero, N., Garrido, C., Simón, A., Pellicer, J., Remohí, M., & Meseguer, M. (Junio de 2004).

Las funciones que se les ha atribuido son: lubricación de mucosas y acumulación de agua para la hidratación de los tejidos, protección de las células frente a proteólisis y ataques o colonización microbiana, inhibición de funciones de células inmunes, además de posibles marcadores en algunos tipos de tumores. Cabe destacar además, la gran capacidad antigénica que posee dicha proteína, debida sin duda al alto grado y diversidad en la glicosilación, y aunque esto a priori facilitaría su estudio por la existencia de gran cantidad de anticuerpos, la realidad es que no existen anticuerpos capaces de reconocer el amplio espectro de variantes existentes entre individuos, por lo tanto, en la práctica es complejo el estudio de esta proteína. ( Martínez, y otros, 2004).

### 2.2.2. Variable 2

Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense. La violencia sexual es un problema de salud pública y de justicia social. La inmediata actuación médico legal, la exploración física general y la buena colecta de indicios, son fundamentales para el diagnóstico certero por el laboratorio forense. Se evaluó durante enero 2008 a 2009 a 215 víctimas de violencia sexual por Medicina Forense y el Laboratorio Biología Forense del Instituto de Investigaciones Forenses. Se aplicaron 3 métodos de alta sensibilidad y especificidad para la búsqueda de semen: Fosfatasa ácida, espermatozoides y Antígeno Prostático Específico (PSA), el mismo que es un marcador específico del varón. La gran mayoría correspondió a delitos de violación y homicidio (91%) de los cuales el 55% de los casos fue sobre niñas de 4 a 17 años. Se analizaron 251 indicios entre hisopados vaginales, anales y prendas colectadas de la víctima, el 28% de los indicios estaban impregnados con sangre. Se detectó presencia de semen en el 60% de las víctimas: Fosfatasa ácida (37%), espermatozoides (25%) y PSA (35%). **(Quispe, Tarifa, Soliz, & Sierra, 2010, págs. 91-95)**

**Crimen Investigación.** *El autor (Kirk, 1953), manifestó en su texto: “Cualquier paso que dé, cualquier cosa que toque, aun inconscientemente, servirá como evidencia silenciosa en su contra. No solo sus huellas digitales o sus impresiones de zapatos, sino su cabello, las fibras de su ropa, los vidrios que rompa, las marcas de herramientas que deje, la pintura que raye, la sangre o el semen que deposite, todos estos y más testigos mudos estarán en su contra. Esta es la evidencia que no se olvida. No se confunde por la emoción del momento. No está ausente por que hay testigos humanos. Es evidencia real. La evidencia física no puede estar equivocada, no puede cometer perjurio por sí misma, no puede estar totalmente ausente. Solo la interpretación puede estar errada, solo la falla humana en encontrarla, estudiarla y entenderla puede disminuir su valor”. (pág. 256)*

**Sexología Forense:** Este examen médico legal puede practicarse indistintamente al niño, al adulto joven o al maduro, y a la mujer violada.

Siguiendo el orden de la exploración médica, se efectúa inspección del área perianal, maniobra básica para informar en el certificado los hallazgos más importantes. Se inicia en el esfínter anal, observando sus características, que pueden ser alteradas por la violación anal en el siguiente sentido: borramiento de los pliegues del esfínter por edema traumático, desgarros, fisuras, despulimiento de las mucosas, lesiones que interesan más allá del esfínter, como perineo y planos profundos; en estos casos, la víctima debe ser trasladada a un centro hospitalario para su atención quirúrgica.

Cuando sea posible practicar tacto rectal, el médico explorador usará guantes estériles y lubricante; por vía digital se detecta el tono del esfínter anal, que puede estar aumentado o disminuido. En el ámpula rectal se buscan cuerpos extraños y lesiones que pueden producirse por la introducción violenta de instrumentos como palos, botellas, varillas, etcétera. Todos los hallazgos del examen proctológico se deben anotar en el certificado médico legal con la mayor claridad, y su resultado debe ser comprensible para el abogado, sin convertirse en dato sugestivo. **(Grandini, 2009, págs. 88-98)**

Protocolo de recolección de indicios biológicos en delitos sexuales. En casos en los que se presume un delito sexual, el semen puede buscarse en la ropa de la presunta víctima y/ o cadáver; en las diferentes zonas anatómicas (vagina, ano, boca, glande, extremidades, etc.)

**Tabla 9**

*Presencia de Espermatozoides en cavidades anatómicas en víctimas de agresión sexual.*

CAVIDAD	ESPERMATOZOIDES INTACTOS	CABEZAS DE ESPERMATOZOIDES
VAGINA	24 Horas	Hasta 7 días
ANO/RECTO	5 Horas (rara vez)	2 a 3 días
BOCA		Hasta 24 horas

*Fuente: Protocolo nacional para la toma, levantamiento, embalaje y envío de indicios y muestras biológicas a los laboratorios forenses de la republica del ecuador.*

El cuadro detalla el tiempo en el que se puede encontrar espermatozoides intactos o únicamente las cabezas, en las diferentes cavidades anatómicas, en víctimas de agresión sexual. Cabe mencionar que la literatura científica muestra una gran variabilidad de datos sobre el tiempo de supervivencia de los espermatozoides y otros componentes seminales en cavidades naturales, a menudo debido a que están basados en declaraciones de las víctimas, que por sus niveles de trauma o por alegaciones falsas no se ajustan a la realidad.

En casos de delitos sexuales es importante preguntar a la víctima si tuvo relaciones sexuales con anterioridad a la agresión (hasta 72 horas). En este caso, los restos de semen pueden pertenecer a la pareja sexual de la víctima, a más de los de su agresor.

## **SEMEN LÍQUIDO**

### **Materiales y Reactivos:**

- Hisopos estériles
- Tijeras estériles
- Tubos de tapa roja
- Tubos cónicos
- Etiquetas
- Bolsas de plástico
- Pipeta de Plástico
- Papel Filtro para muestras biológicas forenses
- Guantes
- Mascarillas
- Gafas de seguridad
- Overol

**Procedimiento:**

- Si disponemos de un volumen de más de 0.5 ml, al aspirarlo con una pipeta de plástico estéril y depositarlo en un tubo cónico o un tubo de tapa roja.
- Etiquetar y embalar el tubo en bolsa de papel. Mantener en condiciones de refrigeración hasta su llegada al laboratorio.
- Si disponemos de un volumen menor de 0.5 ml, fijar el semen en papel filtro para muestras biológicas forenses (embalar y enviar)

Nota: En caso de no disponer de papel filtro para muestras biológicas forenses, sumergir un hisopo estéril, en el semen líquido (< 0.5 ml), dejar secar a temperatura ambiente. Colocar el hisopo dentro de un contenedor

**EXUDADO DE LA CAVIDAD ANAL****Materiales y Reactivos:**

- Hisopos
- Tubos de plástico con tapón de rosca
- Etiquetas
- Guantes
- Overol
- Mascarilla
- Gafas de seguridad

**Procedimiento:**

- Se tomarán dos hisopados por cada región: primero se tomará la región externa y luego se tomará la región interna
- Región Externa: Tomar dos hisopados humedecidos con solución salina, agua estéril o agua inyectable sobre la periferia del ano.
- Región Interna: Tomar dos hisopados a una profundidad del ano de 4 cm en promedio (recto).
- En ambos casos dejar secar y regresar los hisopos con la muestra obtenida a su respectivo contenedor
- Etiquetar cada hisopo indicando el orden en que fue tomada la muestra.

- Embalar de manera individual
- Enviar al laboratorio.

## **EXUDADO DE LA CAVIDAD VAGINAL**

### **Materiales y Reactivos:**

- Hisopos
- Solución salina o agua estéril
- Tubos de plástico con tapón de rosca
- Etiquetas
- Guantes
- Mascarilla
- Gafas de seguridad
- Overol

### **Procedimiento:**

- Se tomarán dos hisopados por cada región: primero la región vulvar y segundo a nivel de vagina.
- Si luego de una inspección visual no se observa secreción a nivel vulvar humedecer los hisopos, con solución salina o agua estéril y tomar la muestra.
- Permitir el secado y almacenar en su respectivo contenedor
- Etiquetar cada hisopo indicando el orden en que fue tomada la muestra.
- Enviar al laboratorio.

## **EXUDADO DE LA REGIÓN DEL GLANDE**

### **Materiales y Reactivos:**

- Hisopos
- Solución salina o agua estéril
- Tubos de plástico con tapón de rosca
- Etiquetas

- Guantes
- Overol
- Gafas de seguridad mascarilla.

**Procedimiento:**

- Tomar la muestra mediante hisopo (dos), de la región del glande. Si luego de una inspección visual no se observa secreción a nivel del glande, humedecer los hisopos, con solución salina o agua estéril.
- Permitir el secado y almacenar en su respectivo contenedor.
- Etiquetar cada hisopo indicando el orden en que fue tomada la muestra y embalar.
- Enviar al laboratorio

## **EXUDADO DE LA CAVIDAD ORAL**

**Materiales y Reactivos:**

- Hisopos o Citocepillos
- Tubos de plástico 15 ml con tapón de rosca o bolsas de plástico
- Tijeras
- Etiquetas
- Guantes
- Overol
- Mascarilla
- Gafas de seguridad.

**Procedimiento:**

- Recuperar la mayor cantidad de muestra que se encuentre en la cavidad bucal principalmente entre los dientes, carrillo y por debajo de la lengua, rotando el hisopo para que se impregne en toda su superficie.
- Repetir el paso 1 con otro hisopo, permitir el secado.
- Introducir los hisopos en sus contenedores respectivos.
- Embalar y etiquetar la muestra, mencionar el orden en el que fueron tomados los hisopos.



- Enviar al laboratorio.
- Otra opción para tomar este tipo de muestra es usar un citocepillo, el cual deberá secarse etiquetarse y embalarse en su empaque original.
- *Nota:* Pasadas las 24 horas no se podrá obtener ADN del agresor en este tipo de muestras.

## **LAVADO DE SEMEN DE LA CAVIDAD ANAL**

### **Materiales y Reactivos:**

- Jeringa desechable de 20ml
- Sonda estéril
- Frasco de plástico con tapa de rosca o tubo de plástico de 15 o 50ml
- Solución salina o estéril
- Etiquetas
- Guantes
- Overol
- Mascarilla
- Gafas de seguridad

### **Procedimiento:**

- Con un volumen de solución salina estéril (5- 10 ml), con la jeringa colocar la sonda.
- Irrigar la cavidad anal de la víctima, introduciendo la sonda 4 o 5 cm de profundidad.
- Aspirar nuevamente el líquido que contiene las células espermáticas de la cavidad.
- Vaciar el contenido de la jeringa a un frasco tapa rosca o tubo cónico. Sellar herméticamente.
- Embalar y etiquetar.
- Enviar al laboratorio.

### **Consideraciones:**

- Cuando se trate de menores de edad, está a consideración del médico el levantamiento de la muestra por medio de la sonda.

## **LAVADO VAGINAL**

### **Materiales y Reactivos:**

- Jeringa de 20 ml desechable
- Sonda estéril
- Frasco de plástico con tapa de rosca o tubo de plástico de 15 o 50 ml
- Solución salina estéril
- Etiquetas
- Guantes
- Overol
- Mascarilla
- Gafas de seguridad

### **Procedimiento:**

- Aspirar un volumen de solución estéril con la jeringa (5-10ml) y colocar la sonda.
- Irrigar la cavidad vaginal de la víctima.
- Aspirar nuevamente el líquido el cual contendrá las células espermáticas de la cavidad
- Vaciar el contenido de la jeringa a un frasco tapa rosca o tubo cónicos estériles. Sellar herméticamente.
- Etiquetar
- Enviar al laboratorio.

## **LAVADO DE PREPUCIO (GLANDE)**

### **Materiales y Reactivos:**

- Jeringa de 20 ml desechable
- Frasco de plástico con tapa de rosca o tubo de plástico de 15- 50 ml
- Solución salina estéril
- Etiquetas
- Guantes
- Overol
- Mascarilla

- Gafas de seguridad

**Procedimiento:**

- Aspirar un volumen de solución estéril con la jeringa (5- 10 ml).
- Irrigar la región del glande en el individuo.
- Colectar el líquido el cual contendrá las células adheridas a la superficie, en un frasco estéril tapa roja.
- Etiquetar
- Enviar al laboratorio

### **LEVANTAMIENTO DE SEMEN SOBRE EL CUERPO**

En caso de cadáver, tomar en cuenta el tiempo transcurrido después de la muerte ya que entre mayor sea este, aumenta la probabilidad de degradación de las células espermáticas.

#### **Materiales y Reactivos**

- Etiquetas
- Guantes
- Cofia y mascarilla
- Hisopos
- Bolsas de papel
- Agua inyectable o solución salina

**Procedimiento:**

- Humedecer dos hisopos estériles con agua inyectable o solución salina.
- Aplicar cada hisopo sin presionar sobre la superficie de la mancha y deslizar de manera circular rotando el hisopo.
- Permitir el secado de los hisopos.
- Si los hisopos utilizados vienen acompañados de su contenedor especial, embalarlos en este.
- Etiquetar y embalar.
- Colocar dentro de una bolsa de papel o plástico y sellar.

- Si el envío es inmediato al laboratorio, conservar a temperatura ambiente; sino, mantener en condiciones de refrigeración.

## **MÁCULAS DE SEMEN EN TELAS COMO CORTINAS, ALFOMBRAS, VESTIMENTAS, ETC.**

### **Materiales y Reactivos:**

- Hisopos
- Solución salina estéril o agua inyectable
- Bolsas de papel
- Tijeras
- Pinzas

### **Procedimiento:**

- Si esta húmeda la mancha dejar secar, recortar alrededor de la misma, y embalarla en un sobre de papel.
- En el caso de las manchas secas sobre superficies lisas o cuero:
- Humedecer dos hisopos con solución salina estéril o agua inyectable.
- Frotar la superficie en donde se encuentra la mancha para recuperar el material biológico.
- Permitir el secado y regresarlo a su contenedor.
- Etiquetar las muestras.
- Enviar al laboratorio.

**( Cisneros & Villarroel, 2016, págs. 14-22)**

Caracterización morfométrica de espermatozoides en pacientes con Espermograma normal. El estudio de la fertilidad masculina se basa en el análisis de las características físicas del semen, entre las cuales, la morfología espermática se considera una de las más importantes para determinar la calidad seminal, pues posee un alto valor predictivo de fertilidad. Existen, sin embargo, diferentes sistemas de evaluación de la morfología espermática normal, así como varias técnicas para la preparación y tinción de las muestras de semen.

Los sistemas informáticos CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) permiten proporcionar datos relevantes de la cabeza (ancho, largo, área,

perímetro) y pieza intermedia espermática (largo, ancho, ángulo y distancia). Estos se han utilizado con éxito en multitud de trabajos desde su comercialización, y su utilidad ha sido validada en diversos estudios, tanto en humanos como en otros mamíferos. Además, a partir de las mediciones de la cabeza espermática se pueden obtener parámetros derivados, mediante fórmulas matemáticas, como la elipticidad, elongación y rugosidad, que brindan información sobre la forma de la cabeza espermática, por lo cual se les suele llamar factores de forma.

Sin embargo, mediante los sistemas CASA, hasta el momento solo se pueden analizar parámetros morfométricos espermáticos de cabeza y pieza intermedia. Con la ayuda de otros programas informáticos de tratamiento y análisis de imagen, como el programa de libre difusión *Image J*®, se pueden obtener otros parámetros adicionales, como la longitud del flagelo espermático.

Otro inconveniente en el uso de sistemas CASA radica en que su eficacia depende, en gran medida, de las técnicas de fijación y tinción usadas para las distintas muestras, ya que pueden alterar notablemente las dimensiones y forma de la cabeza espermática. En un intento de homogeneizar los resultados obtenidos, se han desarrollado numerosos métodos rápidos de coloración, como *Diff-Quik*®, *Rapidiff*®, *SpermBlue*® y *Testsimplets*®. Todos los métodos mencionados son colorantes comercialmente disponibles; sin embargo, por su alto costo no están siempre accesibles para su uso en nuestro medio.

Diversos estudios informan la gran variabilidad de las dimensiones morfométricas en espermatozoides humanos, en dependencia del método de tinción usado. Por ejemplo, en un estudio realizado por R. Henkel, se compara el resultado de los parámetros morfológicos de espermatozoides humanos teñidos con los métodos de *Papanicolaou*, *Shorr* y *Testsimplets*® con resultados que favorecen la utilización de los dos primeros.<sup>13</sup> Posteriormente, L. Maree, al estudiar el efecto de tres técnicas de tinción (*Papanicolaou*, *Rapidiff*® y *SpermBlue*®), sobre las dimensiones de la cabeza del espermatozoide humano, encontró variaciones morfométricas significativas entre los tres métodos. Otros trabajos realizan comparaciones entre métodos más tradicionales, como el ejecutado por E. Aksoy, en el que se comparan varias técnicas de tinción, y

concluyen que los mejores resultados en la evaluación morfométrica de los espermatozoides se obtienen utilizando hematoxilina y eosina (HE), azul de toluidina, el método de *Shorr* y la tinción de *Papanicolaou*.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado un manual de laboratorio para el examen del semen, en el cual se sugiere el uso de los métodos de tinción de *Papanicolaou*, *Shorr* o *Diff-Quik*®, y se establecen estrictos criterios para determinar la morfología y morfometría espermáticas normales.<sup>15</sup> Con la publicación de las diferentes versiones de este manual, se ha intentado universalizar la metodología usada para el espermograma, lo que ha facilitado la comparación de los parámetros seminales entre poblaciones. Sin embargo, cuando se quiere discutir sobre normalidad y anormalidad dentro de una población o un grupo de individuos, la misma OMS sugiere que cada laboratorio trate de establecer los parámetros seminales de referencia que correspondan a su zona de influencia. Teniendo en cuenta que no se han realizado en la provincia de Villa Clara estudios sobre los parámetros seminales que permitan establecer valores de referencia de estos en la población cubana, se decidió determinar las características morfométricas de los espermatozoides de una población de hombres con espermograma normal, estudiados en la consulta de reproducción asistida de esta provincia. **(Triana, y otros, 2015, págs. 225-232)**

El principio de transferencia en la escena del crimen y en el cuerpo de la víctima: El trabajo de investigación busca dar un aporte doctrinal y teórico al Principio de Transferencia en la Escena del Crimen y el Cuerpo de la Víctima; describiendo el Principio de Transferencia, también denominado de intercambio, y que consiste en la transición de los indicios encontrados en la escena del crimen y el cuerpo de la víctima, una vez analizada por los peritos forenses, y aceptada por las autoridades judiciales pasa a ser prueba, su aplicación conduce a descubrimientos determinantes de lo sucedido entorno a la escena del crimen y del cuerpo de la víctima.

La aplicación de técnicas de búsqueda se maneja en la fijación de la escena. Para el estudio del Cuerpo de la Víctima, se trata temas de la inspección técnica del cadáver y las técnicas de recolección.

La actividad criminalística debe acoger los nuevos aportes del principio de transferencia, de manera especial el fiscal junto a la policía judicial y de criminalística tienen la obligación de iniciar y terminar el proceso investigativo de la muerte de una o varias personas, con el manejo de vestigios e indicios que conducirán al esclarecimiento de los hechos suscitados. **(Barrera , 2015)**

**Reconocimiento e identificación de manchas de semen en diferentes soportes de interés forense.** Resumen: El estudio de manchas de semen tiene gran importancia en la criminalística, ya que constituye una prueba precisa y útil en una correcta investigación mediante una serie de normas o protocolos estandarizados; este estudio está asociado directamente a Crímenes de Índole Sexual. El objetivo del presente trabajo es el reconocimiento e identificación de las manchas de semen a través de una mejor técnica de tinción. Se evaluó ocho tipos de soportes, entre fibras de algodón y fibras sintéticas en el Laboratorio de Biología Forense de la Dirección de Criminalística del Perú, aplicando el Método Directo para manchas de semen con las coloraciones Gram y Cristal violeta. Se logró el reconocimiento de las manchas de semen en los diferentes soportes y se determinó que ambas técnicas de tinción pueden ser utilizadas en la Prueba de certeza (microscopía) teniendo en cuenta que la tinción Gram permite una mejor visualización y diferenciación de otros tipos de células y/o bacterias. **(López, 2013)**

**Guía de procedimientos para la evaluación médico forense de los delitos sexuales.** La implementación del sistema penal acusatorio requiere cambios en las instituciones involucradas en el nuevo modelo de administración de justicia. Al Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses **(IMELCF)**, institución técnico-científica de cobertura nacional, le corresponde aportar las pruebas científicas necesarias a los diferentes tipos de investigaciones judiciales.

Ante el inminente cambio en el modelo de administración de justicia, en el año 2005 se diseñó un proceso de modernización y profesionalización del Instituto; reingeniería institucional que incluía, entre otros objetivos, la preparación de los profesionales de la medicina en la especialidad, a nivel de maestría, y el establecimiento de normas y guías de los procedimientos periciales.

El IMELCF, además de ser una institución de servicios periciales, es un centro docente, de referencia nacional en cuestiones médico-legales.

Para los fines de esta guía, se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica y un análisis de los procedimientos técnico-científicos relacionados, tanto nacionales como internacionales.

Esta guía debe considerarse como una herramienta de trabajo que permita asegurar una atención pericial de calidad en materia de delitos sexuales, garantizando la correcta preservación, registro y documentación de los indicios y/o elementos; su estudio y análisis; así como también una adecuada interpretación de los hallazgos y resultados en el contexto de la información de que se disponga sobre el hecho investigado.

El presente documento; también pretende, estandarizar los criterios periciales en todas las agencias del Instituto y brindar al perito médico los argumentos científicos necesarios para sustentar su dictamen ante las autoridades competentes.

La guía está destinada, principalmente, a la orientación del perito médico, para que brinde una atención competente y eficaz, con las debidas garantías de respeto, integridad y protección de sus derechos humanos. Además, mediante el abordaje integral de los casos pretende ser una importante contribución a la recta administración de justicia.

Esta guía, también debe servir de material para la consulta de las partes intervinientes en los procesos judiciales, incluyendo a las autoridades investigativas y a los demás profesionales médicos y funcionarios del ámbito clínico-asistencial. **(Instituto de medicina legal y ciencia forense P. , 2011)**



Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. El Capítulo 2 del presente manual, referido al examen del semen humano, ha sido dividido en tres partes principales. La primera de ellas describe los procedimientos considerados esenciales para la evaluación del semen (Sección 2A, 2.1 a 2.6).

La segunda parte comprende los procedimientos considerados *par* la mayoría de los laboratorios como opcionales, pero que pueden ser de gran valor clínico diagnóstico (Sección 2B, 2.7 a 2.12). La tercera parte (Sección 2C, 2.13 y 2.14) incluye métodos que evalúan la capacidad funcional del esperma y desarrollos en análisis computarizados sobre la morfología del esperma.

Estas técnicas no están disponibles en todos los laboratorios, pero pueden ser útiles para la evaluación de la subfertilidad masculina, para estudios sobre toxicología reproductiva o como herramientas para la investigación. En la sección de procedimientos estándar que describe la morfología del esperma, este manual recomienda la tinción de Papanicolaou como el método de elección y el uso de una clasificación simplificada de la morfología del esperma de acuerdo al llamado

'Criterio Estricto'. El análisis seminal asistido por computadora para medir la motilidad espermática y el ensayo de penetración de ovocitos de hamster sin zona pellucida, han sido incluidos en la sección dedicada a las pruebas opcionales, ya que las mismas pueden tener aplicación para el diagnóstico. La sección que comprende las pruebas utilizadas para la investigación ha sido actualizada para reflejar el consenso actual sobre la evaluación de la capacidad funcional del espermatozoide. El fundamento estadístico de los errores de conteo involucrados en el análisis de semen, ha sido agregado y el capítulo que trata sobre control de calidad ha sido ampliado para incluir discusiones sobre metodologías prácticas, para la implementación del control de calidad en cualquier laboratorio de andrología. El Apéndice I incluye un listado de valores de referencia de las variables de semen. Debe destacarse que no es el propósito del presente manual establecer los mínimos valores de semen compatibles con el logro de un embarazo, *in vivo* o *in vitro*. Fue difícil llegar a un acuerdo en algunos aspectos de la evaluación de la morfología del espermatozoide y en la

provisión de rangos de referencia, ya que la evaluación morfológica continúa siendo subjetiva. Los rangos de referencia para el semen humano presentan algunas dificultades conceptuales. La relación entre la calidad del semen y la fertilidad se complica debido a otros factores, incluyendo la fertilidad femenina. Además, los hombres que producen semen anormal pueden aun ser fértiles, mientras que los hombres que producen semen de calidad superior al promedio producen embarazos en una frecuencia más elevada que la promedio. Este manual no está diseñado exclusivamente para aquellos laboratorios que tratan a parejas con subfertilidad. Está dirigido también a aquellos laboratorios que investigan los métodos para la contracepción masculina y participan en estudios de toxicología reproductiva.

En este contexto, es importante para este manual proveer valores de referencia basados en estudios multicentricos de poblaciones de hombres normales, y no solo los requerimientos mínimos para la fertilización. Además, este Manual sugiere la conveniencia que cada laboratorio establezca sus valores de referencia basados en las muestras de semen de hombres que han inducido un embarazo recientemente.

Finalmente, se debe enfatizar que el principal propósito de este manual es promover el uso de procedimientos estándar para el análisis del semen y de esta manera establecer los valores de referencia (anteriormente llamados "valores normales". Esto permitirá la comparación de datos entre diferentes laboratorios y la sumatoria de resultados de diferentes fuentes para su análisis. La atención a los detalles de los procedimientos estándar debería mejorar su precisión y reproducibilidad. Se mantiene el principal objetivo de las ediciones anteriores: proveer un manual de laboratorio que atienda las necesidades de los médicos e investigadores de los países en desarrollo. **(Organización Mundial de la Salud., 2001, págs. 9-71)**

**MARCO CRIMINOLÓGICO:** La criminología es una de las ciencias que participan en la investigación de un hecho delictivo. César Lombroso la define como "la disciplina que se ocupa del estudio del fenómeno criminal, con el fin de conocer sus causas y formas de manifestación."

“Los violadores presentan un comportamiento y un estilo de personalidad más parecido al de quienes han cometido agresiones y robos con intimidación”

Se puede decir entonces que es la disciplina encargada del estudio de las causas del crimen, incursionando en métodos que reconstruyan el comportamiento antisocial del hombre. Al formar parte del grupo de las ciencias forenses, la criminología se considera una ciencia interdisciplinaria empírica, ocupándose de estudios integrantes del crimen, es decir, se estará ocupando del crimen, del delincuente, de la víctima, de la sociedad y del comportamiento desviado, basando siempre sus fundamentos en conocimientos propios de la sociología, psicología y la antropología, respaldada con la medicina y el derecho penal.

Los autores que han desarrollado investigaciones y realizado aportaciones a la criminología coinciden en que las áreas de investigación incluyen la incidencia, formas, causas y consecuencias del crimen, siendo el soporte de su estudio en las reacciones sociales y las regulaciones gubernamentales generadas para frenar al crimen. El desarrollo de la sociedad y múltiples factores sociales, económicos y políticos han desencadenado distintas inquietudes, generando los trastornos relacionados con la personalidad antisocial y conductas antisociales.

Al conocer las causas de la conducta antisocial la criminología tratará de encontrar métodos para prevenirlas o erradicarlas, y si aun así se llevase a cabo la conducta antisocial, dará tratamiento para su rehabilitación, así como el modo de operación de las instituciones penitenciarias para la reinserción de los infractores a la sociedad.

La criminología, una disciplina de carácter multidisciplinario, estará basando sus fundamentos en conocimientos de la sociología, psicología y la antropología social, tomando para ello el marco conceptual que delimita el Derecho penal, de esta manera podrá estudiar las causas del crimen y propondrá los remedios del comportamiento antisocial del hombre. Por su parte, el perito criminólogo-criminalista estará capacitado para la prevención del delito en la disminución de la criminalidad, realizando estudios al agresor. De esta manera colaborará en la investigación interviniendo en los peritajes determinados para

el fin que se persigue, hacer investigaciones y peritajes en determinada área, etcétera. En el área de la criminología el perito se estará adentrando en el comportamiento, haciendo un estudio desde la infancia del victimario para conocer los motivos que lo llevaron a incurrir en una falta. ( **López, y otros, 2014, págs. 8-17**)

### **Indicios biológicos: hallazgo, recolección y traslado**

Los indicios biológicos generalmente se encuentran bajo un estudio muy completo, en otros indicios o bien en el lugar del hecho, por tanto, también son llamados ‘indicios indeterminados’ ya que por su composición y estructura física se requiere de un análisis completo para su clasificación, tal es el caso de pelos, fibras, líquidos (orina, vómito, semen, saliva, cerveza, etcétera), polvos, manchas, pastillas (no importa se encuentren con su etiqueta, frasco, envoltura o sin ella).

Estos indicios requieren de una maniobra delicada, evitando su contaminación, extravío o degradación, los indicios varían dependiendo la situación de hallazgo, por ejemplo:

1. **Si se inspecciona el lugar del hecho.** Se encuentran manchas secas o frescas, correspondientes a semen, saliva, sangre, orina o cualquier fluido corporal. Generalmente, se encuentran en sábanas, preservativos, pisos, pañuelos desechables, toallas, etcétera. El procedimiento de levantamiento y embalaje es el mismo que en los indicios materiales.
2. **Si se realiza una inspección a la víctima.** Para encontrar estos indicios es importante y necesario realizar un examen ginecológico, otro andrológico y por último un proctológico.

El estudio ginecológico “se basa en el examen que se realiza en los órganos genitales externos de una mujer relacionada con un delito sexual. Se requiere la orden por el oficio del Ministerio Público con el consentimiento manifiesto de la examinada siempre ante la presencia de un testigo del sexo femenino, preferentemente un familiar de la víctima. Su finalidad es: 1, diagnosticar acceso carnal; 2, diagnosticar la manera en que fue realizado éste (vía de entrada, empleo de violencia física, etc.); 3, diagnosticar vinculación con

el acusado (huellas de coito reciente, indicios de semen, pelos, etc.); 4, diagnosticar embarazo; 5, diagnosticar enfermedades de transmisión sexual.”

La obtención de la información estará basada en dos aspectos:

“Los delincuentes sexuales de infantes presentan menos estabilidad emocional y rasgos de personalidad agresiva que los agresores sexuales de adultos”

- **Interrogatorio.** Se llevará a cabo de manera personal a la víctima, tratando de conocer los aspectos personales y la relación que mantuvo con el victimario.

- **Exploración física.** Se llevará a cabo en un lugar privado en presencia de un familiar y un médico, ambos del mismo sexo que la víctima, abarcando los siguientes aspectos: estado mental, edad clínica, si es púber o no, si existe desfloración completa o incompleta, huella de violencia, signos clínicos de embarazo, enfermedades venéreas y otras observaciones.

Por otra parte, el estudio andrológico “se basa en el examen de los órganos genitales externos de un hombre relacionado en un ilícito sexual. Se aprecian las condiciones generales del vello pubiano, del pene y en la bolsa escrotal. Se realiza la retracción del prepucio para observar el glande, el frenillo y el surco balanoprepucial. Este estudio se realiza en presuntos participantes activos en los delitos sexuales (en el sujeto pasivo se realiza un estudio ginecológico o proctológico), para el estudio deberá de existir una orden judicial y además el consentimiento expreso del examinado.” La finalidad del estudio es precisar algunos aspectos como:

- Características generales del vello pubiano, del pene, del escroto y de los testículos, así como anomalías de los mismos (atrofias, hipotrofias o hipertrofias, criptorquidias, hernias, etcétera).

- Signos de coito recientes, observando una congestión del pene en periodo inmediato, presencia de sangre con características iguales a la víctima, salida de líquido seminal y presencia de alguna sustancia sugestiva de acceso carnal, siendo siempre necesaria la toma de muestra a través del raspado con hisopo en glande, meato urinario y en el surco balanoprepucial.

- Signos de coito reciente efectuado con violencia (no consentido). En todos los casos, sin excepción, siempre habrá lesiones de mayor o menor intensidad como edema, equimosis, desgarros en glande, frenillo o prepucio. Huellas de mordedura por parte de la víctima, como manchas de sangre, pelos o material fecal de la víctima.

- Signos que vinculen con el delito investigado, tomando muestras de pelo pubiano para su confrontación, de manchas del sujeto examinado.

- Detectar signos de alguna enfermedad por transmisión sexual.

- Capacidad de erección del sujeto examinado.

- Características somatométricas del presunto agresor, para correlación con la víctima y el delito investigado, como son su edad, estatura, peso, complexión, fuerza física para vencer a la víctima, así como sus características psíquicas.

**El examen proctológico** “se basa en el estudio realizado en el ano y regiones vecinas (glúteos y periné) en personas de ambos sexos, víctimas de un presunto delito sexual y en las que se supone hubo penetración por vía rectal. El examinado se coloca en posición genupectoral [plegaria mahometana] y se observan las características del esfínter anal (sus pliegues radiados y el tonismo esfinteriano) y de sus regiones vecinas.”<sup>8</sup> El ano es la abertura periférica del recto y corresponde al orificio terminal del tubo digestivo, el conducto anal del adulto mide 3.75 centímetros y a la mitad de éste la mucosa anal se transforma en piel. En el caso de penetración no consentida, pueden encontrarse lesiones anales y perianales como equimosis, desgarros, erosiones y huellas de sangre, así como borramientos de los pliegues anales y disminución del tono del esfínter anal. Esta relajación puede ir acompañada de incontinencia fecal y deformación del ano por el reflejo producido por el dolor, lo que se conoce como ‘parálisis esfinteriana antálgica espontánea’.

La descripción de las lesiones anales se hará al igual las que del himen, de acuerdo con la posición de las manecillas en la carátula del reloj y con un orden secuencial de la izquierda a derecha, las lesiones típicas o signos patognómicos de penetración anal reciente no consentida son:

1, desgarro de forma triangular a las seis horas con base en el margen anal y vértice en el periné, es el llamado Signo de Wilson Johnston;

2, desgarros en algunos de los pliegues anales;

3, desgarros rectoperineales;

4, hemorragias ano rectal o perineal;

5, lesiones extragenitales como equimosis en abdomen, músculos y glúteos, excoriaciones peribucales y en nariz para evitar que la víctima solicite auxilio, sugilaciones y/o mordeduras en cuello y espalda, etcétera.

También puede tomarse como un signo orientador de pederastia la presencia de verrugas genitales en región anal o perineal.

Es importante señalar que los signos mencionados no son patognomónicos de penetración anal, ya que también pueden presentarse, aunque en menor grado, en algunas entidades patológicas, como son: constipación intestinal o estreñimiento crónico, los traumatismos directos, la presencia de hemorroides, la falta de aseo anal. Por tanto, la muestra con hisopo para la determinación de Fosfatasa Ácida Prostática y/o la búsqueda de espermatozoides y sangre en el laboratorio confirmarán o descartarán el coito anal. **( López, y otros, 2014, págs. 18-22)**

La interpretación de la prueba pericial bioquímico forense realizada en fluidos corporales humanos: análisis jurídico – científico en la investigación de los delitos sexuales: Los aportes de la ciencia y la tecnología abarcan la totalidad de la vida del ser humano y sus relaciones de convivencia, se encuentran incluso en las distintas disciplinas del saber jurídico por medio de las Ciencias Forenses. Por tal motivo, cada vez es más imperante que los operadores del derecho sean profesionales interdisciplinarios, con conocimientos más allá del saber jurídico que les permitan aprovechar al máximo el saber científico dentro de los procesos judiciales.

Dentro de las ciencias naturales aplicadas al derecho la Bioquímica Forense aporta elementos de prueba sumamente relevantes para la investigación de diversos delitos sexuales, tanto es así que el Organismo de Investigación Judicial de Costa Rica cuenta en su Departamento de Laboratorios

de Ciencias Forenses con secciones especializadas en esta disciplina, donde se realizan una diversidad de pericias de carácter presuntivo y confirmatorio para la presencia de fluidos biológicos, enfermedades de transmisión sexual e identificación de ADN mediante marcadores genéticos.

La importancia de este trabajo de investigación es que provee información actualizada con respecto de la correcta interpretación de las pericias bioquímicas forenses realizables para la identificación de semen, sangre y saliva humana en la investigación de delitos sexuales, utilizando un lenguaje científico y jurídico que permita aprovechar al máximo esta información en el proceso penal. Persiguiendo este fin, el problema planteado se dirigió a investigar la correcta interpretación de las pruebas bioquímico forenses realizadas en semen, sangre y saliva en la investigación de los delitos sexuales y el objetivo principal fue, precisamente, interpretar jurídica y científicamente la prueba pericial bioquímico forense realizada en fluidos corporales humanos durante la investigación de los delitos sexuales.

Para ello, la metodología empleada fue exploratoria y analítica descriptiva, con un enfoque principalmente cualitativo mediante una revisión doctrinaria jurídica y científica, recopilación de jurisprudencia relacionada y análisis de dictámenes Criminalísticos de la Sección de Bioquímica del Departamento de Laboratorios Forenses del Organismo de Investigación Judicial emitidos durante la investigación de delitos sexuales.

A raíz de este estudio, se concluyó entre otras cosas que existen dos tipos de pericias realizables para la identificación de fluidos biológicos, cada una con un valor vinculante distinto. Además, fue evidente que, debido al léxico científico empleado a la hora de emitir un dictamen bioquímico forense, para realizar un aprovechamiento adecuado de la información que de éste se desprende, resulta indispensable contar con conocimientos básicos sobre la materia. Estos conocimientos, a su vez, se aportan en este trabajo de investigación, de forma que no sólo se realiza una recomendación, sino que se ofrece una solución didáctica al problema, dando así un aporte multidisciplinario característico del Derecho Científico. **(Chaves, 2014, págs. 171-244)**



Se reportaron 6,118 casos de violencia sexual entre enero y septiembre del 2017. 3,125 fueron violaciones sexuales, según cifras del Ministerio de la Mujer. La mayoría de casos de violación sexual tuvieron víctimas menores de 17 años. Fuente: Ministerio de la Mujer y Poblaciones Vulnerables

En el Perú el abuso sexual a la mujer es cosa de todos los días y las cifras respaldan esta triste realidad. Entre enero y septiembre de 2017 el Ministerio de la Mujer ha registrado a través de los Centros Emergencia Mujer (CEM) 6,118 casos atendidos de violencia sexual, de los cuales 3,125 fueron violaciones.

Entre las víctimas de violación sexual, 2,160 de ellas tienen menos de 17 años, 932 entre 18 y 59 años y 33 más de 60. Los casos de violación sexual tuvieron mayor incidencia en las regiones Lima (894), Junín (264), Arequipa (177), La Libertad (170) y Cusco (161).

El CEM registró 65,989 casos de violencia de género atendidos hasta septiembre, que engloban violencia económica, psicológica, física y sexual. 38,082 (57.7%) de las víctimas interpusieron denuncias. Poco respeto por la mujer en el Perú

La fundación Thomson Reuters indicó en un informe publicado este mes que la capital Lima está entre las 10 mega ciudades (aquellas con más de 10 millones de habitantes) más peligrosas del mundo para las mujeres. La violencia sexual y el bajo acceso a políticas de salud públicas pusieron a Lima en el quinto puesto de este ranking deshonroso.

El Estudio multipaís de la OMS sobre la salud de la mujer y la violencia doméstica, realizado en 2005 en 10 países, recogió que el 24% de las mujeres del Perú rural indicaron que su primera experiencia sexual había sido forzada. **(Schmitt , 2017)**

Violencia sexual en el Perú: Un estudio de casos judiciales: Asimismo se ha observado que en las investigaciones fiscales que forman parte del estudio no se ha previsto el ofrecimiento de medio de prueba alguno que sustente la reparación civil. Si bien se han actuado en juicio las declaraciones de los peritos que efectuaron las pericias psicológicas a las víctimas, éstas fueron

consideradas pruebas de cargo del delito mas no se tomaron en cuenta para la probanza del daño a la agraviada.

Otra nota característica de las carpetas judiciales a las que la Defensoría del Pueblo ha tenido acceso, es la escasa frecuencia con que se acude al lugar de los hechos, a pesar de que en la mayoría de casos estaba plenamente identificado, más aún si estos delitos fueron cometidos en su mayoría por una persona conocida de la agraviada, en su domicilio o en el domicilio del imputado. Cabe tener en cuenta que el Reglamento de la Cadena de Custodia de Elementos Materiales, Evidencias y Administración de Bienes Incautados del Ministerio Público, señala que la escena es el foco aparentemente protagónico en el cual el autor o partícipe consciente o inconscientemente deja elementos materiales o evidencias, huellas y rastros que puedan ser significativos para establecer el hecho punible y la identificación de los responsables. De la rapidez con que se acuda al lugar de los hechos y de la pericia y cuidado que se observe en la identificación y recolección de evidencias depende el éxito o fracaso de una investigación.

La diligencia en las investigaciones supone hacer uso de todos los medios disponibles para hallar la verdad y ofrecer justicia a la parte agraviada. En este sentido es necesario destacar una investigación, que se puede calificar de diligente, en la que la PNP, ante la denuncia de una mujer que había sido violada por un sujeto al que no conocía y que se hizo pasar como dueño de una cabina de internet en el que requería contratar a una empleada, haciendo uso de la tecnología informática efectuó un operativo a partir del *modus operandi* del imputado, con lo que logró que volviera a citar a la que él creía otra mujer en busca de trabajo, oportunidad en la que fue capturado, procesado y condenado. **(Defensoría del Pueblo, 2011, págs. 73-75)**

Identificación de espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras. La violencia sexual es un problema mundial, y representa un delito grave que frecuentemente es difícil imputar, ante la ausencia de testigos. La valoración de las muestras de semen enviadas al laboratorio, para la detección de espermatozoides, es de gran importancia para encontrar al agresor;

sin embargo, la evidencia no es sencilla, por la presencia de otros organismos y la labilidad espermática. El objetivo del presente estudio fue identificar espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras. Se aplicaron diferentes técnicas y recursos microscópicos. Se seleccionaron 46 muestras de semen fresco. Se dividieron en dos grupos: G1 normo u oligozoospermicas (n = 28) y G2 azoospermicas (n = 18). Cada muestra se diluyó 1:1 con solución fisiológica y se agregaron 0.05 mL de suspensión de levaduras *Candida albicans*.

Como control, se procesaron testigos puros de espermatozoides (CE) y levaduras (CL). Las muestras se analizaron con microscopio óptico (MO), contraste de fase (CF), de luz polarizada (LP) y microscopio fluorescente (MF) con diferentes técnicas de tinción. El tinte Papanicolaou mostró mayor eficiencia que el tinte hematoxilina verde brillante ( $P < 0.05$ ) para identificar espermatozoides con microscopio óptico. La detección de elementos refringentes mostró mayor correlación con la presencia de espermatozoides (CF:  $r = 0.966$ ;  $P < 0.001$ ), que la presencia de elementos birrefringentes (LP:  $r = 0.737$ ;  $P < 0.001$ ) y elementos fluorescentes (MF:  $r = 0.487$ ;  $P < 0.05$ ). La microscopía confocal con tinción de blanco de calcofluor azul de Evans y naranja de acridina permitió la identificación de contaminación por levaduras. El empleo de técnicas microscópicas auxiliadas con técnicas de tinción permite confirmar la presencia de espermatozoides enteros o fragmentados en muestras de semen contaminadas con levaduras. **(Bouvet, Pavesi, Paparella, & Ombrella, 2017, págs. 23-35)**

**“Asociación de resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual”:** En Guatemala, existe un alto índice de casos de violación sexual. En el año 2009 el Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala –INACIF- recibió más de 10,000 indicios para ser analizados, asociados a este tipo de delito. Dichos indicios van desde hisopados vaginales, orales, anales y otros provenientes de regiones anatómicas donde se sospecha la presencia de fluidos biológicos, hasta prendas de vestir y otras

superficies que puedan contener material biológico útil para ser analizado **(Guatemala, INACIF 2009)**.

El semen y los espermatozoides son encontrados con mayor frecuencia en indicios provenientes de agresiones sexuales, por lo que actualmente existen procedimientos universales para su detección e identificación. Entre estos procedimientos se incluye la detección de la enzima fosfatasa ácida (FA) que indica presencia presuntiva de semen, utilizando el reactivo Brentamina para su identificación. La detección de Proteína Seminal P-30 o Antígeno Prostático Específico (PSA), a diferencia del carácter presuntivo de la FA, confirma la presencia de fluido seminal humano, ya que es una glicoproteína secretada por la próstata y presente en dicho fluido. Finalmente, se investiga la presencia de espermatozoides a través de la tinción de los mismos por el método de Árbol de Navidad. Una vez realizados dichos análisis y determinada la presencia de semen y/o espermatozoides, se busca establecer si existe en ellos Ácido Desoxirribonucleico (ADN) útil para poder obtener un perfil que pudiera ser comparado con el perfil genético del (los) sospechoso(s) **(Benton, Donahu y Valdez, 1998; Hochmeister, Rudin, Borer, Kratzer, Gehrig y Dirnhofer, 1999)**.

Actualmente no existen estudios que establezcan la asociación existente entre la obtención de perfiles genéticos, y los resultados obtenidos en la detección de semen y espermatozoides, a partir de indicios provenientes de casos de violación sexual. Por lo que el presente estudio busca establecer dicha asociación, determinando estadísticamente, la relación que existe entre dichos resultados y la posterior obtención de un perfil genético. Además, busca determinar cómo influye el tipo de indicio analizado y su procedencia en los resultados obtenidos por la Sección de Genética de INACIF, brindando así, herramientas útiles para poder presentar con un mayor soporte científico, los resultados genéticos obtenidos. La determinación de dicha asociación se realizará estableciendo la razón de posibilidades existente entre la obtención de un perfil genético y cada una de las tres pruebas utilizadas para la determinación de semen y espermatozoides **(García, 2012)**

La transformación del tipo penal de la violación sexual: La categoría “violación sexual” aparece dentro de la de “violencia sexual”. Esta refiere a un amplio conjunto de situaciones en las que se vulnera la “libertad sexual” o la “integridad sexual” de una persona. La violencia sexual implica una acción en la que una o más personas ejercen sobre otra “comentarios”, “insinuaciones” o “acciones” “para consumir” o “intentar el acto sexual” (actos que pueden darse en diferentes espacios de la vida cotidiana y contextos de guerra, invasión o violencia política). En un intento por construir un concepto amplio, la Organización Panamericana de la Salud define “violencia sexual” como:

Todo acto sexual, la tentativa de consumir un acto sexual, los comentarios o insinuaciones sexuales no deseados, o las acciones para comercializar o utilizar de cualquier otro modo la sexualidad de una persona mediante coacción por otra persona, independientemente de la relación de esta con la víctima, en cualquier ámbito, incluidos el hogar y el lugar de trabajo (Organización Panamericana de la Salud 2005:161).

Este amplio sentido de violencia sexual incluye al delito de “violación sexual”, cuya definición varía según los códigos penales y las perspectivas teóricas, así como el énfasis en sus elementos “constitutivos” como la  *fuerza* , el  *consentimiento*  o la  *penetración* . Por ejemplo, el Tribunal Penal Internacional para Ruanda definió las violaciones sexuales como:

El acto sexual no consentido, actos que pueden incluir la inserción de objetos o el uso de ciertos orificios corporales que no sean considerados como sexuales (International Criminal Tribunal from Rwanda 1998: párrafos 596-597).

La violación sexual incluye para la mirada normativa penal la “penetración” forzada físicamente, sea por vía vaginal, anal u oral, ya sea del “miembro viril”, otras partes corporales o un objeto (Organización Panamericana de la Salud 2005: 161). De acuerdo a esto, la violación sexual podría ser cometida por varones o mujeres y el sujeto pasivo serían tanto varones, mujeres, niños, niñas y adolescentes. La violación sexual puede ser perpetrada por el “cónyuge”, “concubino”, “enamorado”, “desconocido”, persona que mantenga algún vínculo de autoridad con la víctima, etcétera. En esa línea, en el Perú, la violación sexual,

cuya conducta base se encuentra tipificada en el artículo 170 del Código Penal, se define de la siguiente manera:

El que con violencia o grave amenaza, obliga a una persona a tener acceso carnal por vía vaginal, anal o bucal o realiza otros actos análogos introduciendo objetos o partes del cuerpo por alguna de las dos primeras vías (Código Penal de 1991: Artículo 170). **(Mujica, 2011, págs. 18-17)**

### **Acuerdo plenario N° 4-2015/CIJ-116: Asunto: Valoración de la prueba pericial en delitos de violación sexual**

Capítulo II Fundamentos jurídicos:

§ 4. El examen médico legal en delitos sexuales:

24°. La medicina legal es la especialidad médica que brinda los conocimientos de salud al sistema de administración de justicia nacional. Es considerada una ciencia ya que utiliza un método para generar un conocimiento de tal naturaleza y comprobable, el cual es frecuentemente solicitado por las autoridades competentes [PACHECO DE LA CRUZ, José Luis/ PACORA PORTELLA, Percy/DE LA CRUZ CHAMILCO, Nancy/ DÍAZ CUBAS, Noelia: *Violencia y abuso sexual contra la mujer: Evaluación médico legal y clínico terapéutico de la mujer agredida física y/o sexualmente.*

25°. En una víctima de violación sexual, se debe establecer si ha sido objeto o pasible de desfloración vaginal, acto contranatura y de otras lesiones físicas al cuerpo. El profesional examinador, además de apreciar estas zonas físicas, deberá obtener todo vestigio material que se relacione con este delito, tal como vellos púbicos, manchas de semen y muestras de contenido vaginal y/o anal, entre otros. Siendo el pene, los dedos u otros objetos duros de superficie roma, agentes clasificados como contundentes, se observarán lesiones denominadas contusas. Así, pues, las lesiones del himen relacionadas a un abuso sexual serán identificadas y evidenciadas como desgarros o laceraciones, equimosis y tumefacciones del borde himeneal.

26°. Respecto al examen proctológico, la exploración médica implica la inspección del área perianal. Se inicia en el esfínter anal, observando sus características, que pueden ser alteradas por la violación anal en el siguiente

sentido: borramiento de pliegues del esfínter por edema traumático, desgarros, fisuras, despulimiento de las mucosas [GRANDINI GONZALES, Javier: *Medicina forense*, Mc. Graw Hill, México D.F., 2010, p. 101].

27°. La Guía Médico Legal-Evaluación Física de la Integridad Sexual del Ministerio Público señala los requisitos mínimos para realizar la evaluación física integral en casos de violencia sexual, a saber: a) El examen debe ser realizado por dos peritos como mínimo, en ausencia de otro y/o en caso de urgencia podrá ser realizado solo por un 88 perito. b) Para su realización deberá ser asistido por un personal auxiliar capacitado, y de preferencia femenino. c) Se podrá contar además con la presencia de cualquiera de las siguientes personas según voluntad expresa del evaluado: i) familiar, ii) personal femenino de la PNP, iii) personal femenino acompañante (custodio, tutores, asistentes sociales), d) si se realiza por un solo perito debe realizar la perennización del examen, previo consentimiento del evaluado, o, en su caso, de su familiar si es menor de edad, y según la logística disponible (cámara fotográfica o video cámara), e) debe contarse con un ambiente o consultorio adecuado, con buena iluminación, mobiliario e instrumental. **(Acuerdo plenario N° 4-2015/CIJ-116, 2016, págs. 87-88)**

Dentro de la medicina legal el estudio citológico del espermatozoide es un hecho importante por sus implicancias en el Derecho Penal. La investigación citológica de espermatozoides se realiza en manchas, hisopados, secreciones y mezclas de ellas. Para ello se deben aplicar tinciones que permitan identificar al espermatozoide por sus características morfológicas.

Nuestro objetivo fue evaluar la aplicación de la tinción Hematoxilina-Verde Brillante para identificar espermatozoides en muestras Forenses. Se trabajó con 47 muestras provenientes de materiales de presuntos delitos sexuales y para evaluar la tinción en estudio se utilizó como referencia la tinción de Papanicolaou. Se recuperaron los espermatozoides mediante maceración simple seguida de centrifugación y con el sedimento se realizaron 2 extendidos, se fijaron con alcohol éter y se aplicaron ambas tinciones utilizando colorantes de primera aplicación (no recuperados) para evitar el arrastre de material proveniente de

coloraciones previas. Los extendidos tenidos se analizaron con microscopio óptico y objetivo de inmersión

(100x). Se consideró como resultado positivo cuando se encontró al menos un espermatozoide completo, presuntivo si solo se hallaron cabezas y negativo cuando no se observaron células espermáticas. En 36 muestras (77.2%) se observaron los mismos resultados al aplicar ambas tinciones, cabe destacar que 24 (51.1%) fueron resultados presuntivos (solo cabezas). Se realizó el análisis estadístico aplicando la prueba  $\chi^2$  y se encontró asociación estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos con ambas tinciones ( $p < 0.001$ ), lo cual indica que para la búsqueda de espermatozoides en la práctica forense se puede aplicar la tinción de

Hematoxilina-Verde Brillante. Aconsejamos su utilización porque permite observar en colores diferentes cabezas y cola de espermatozoides, lo cual es importante en química legal, además de su bajo costo y simplicidad operativa. **(Pavesi, y otros, 2015)**

**La mujer como sujeto especial de protección en las políticas públicas de desplazamiento forzado: Una muestra de la realidad:** Estadísticamente se ha comprobado que en la mayoría de los delitos sexuales es posible recuperar evidencia física, por lo que es importante emplear un procedimiento validado para el análisis de la misma, es por esto que surge la pregunta ¿Es efectivo un proceso de validación para la determinación de la enzima P-30, aplicable en investigación de delitos sexuales?

En efecto, la determinación de P-301, es útil porque es una prueba sensible con respecto a las otras pruebas para determinación de semen en elementos materia de prueba provenientes de delitos sexuales como prueba de biología forense.

Por tal razón, es necesario validar en el laboratorio de identificación humana de la Universidad Manuela Beltrán la prueba de biología forense de la determinación de P-30 utilizando la técnica SERATEC2, esto por cuanto toda prueba, así haya sido estandarizada por la casa comercial, debe ser validada en el sitio donde se va a realizar.



El principal problema en la investigación de delitos sexuales, es evidenciar la presencia de semen en las víctimas ya que estas acuden al examen médico horas o días después de haber ocurrido el hecho, haciendo más difícil la detección de espermatozoides en los fluidos, manchas corporales y prendas. Adicionalmente, los espermatozoides pueden no estar presentes en las muestras, puesto que son eliminados rápidamente de la vagina ya que son lábiles al medio en que se encuentran o porque los sospechosos son vasectomizados o azoospermicos; por lo cual, la falta de los mismos en ningún momento es indicativo de ausencia del delito sexual.

Por este motivo, hacia 1985 se empieza a utilizar como herramienta de las Ciencias Forenses la P-30, una proteína identificada en altas concentraciones en semen en 1978 y que al parecer era específica de especie y de tejido. Los procedimientos implementados en ese momento y hasta la fecha en la mayoría de países (contrainmunolectroforesis y/o ELISA) alcanzan una sensibilidad de 0,4 y 0,03 ng/ul respectivamente hasta las 72 horas pos coito. Sin embargo, actualmente se ha demostrado que esta proteína se encuentra presente en otros tejidos como saliva, líquido amniótico, orina y flujo vaginal entre otros, en concentraciones bajas, por lo cual fue necesario definir las concentraciones promedio en cada tejido siendo ahora, la sensibilidad, en términos de concentración, un punto crítico en la elección del método, ya que pueden generarse falsos positivos y teniendo en cuenta que su principal uso es para la Determinación de Cáncer de Próstata, las casas comerciales se han encargado de diseñar test rápidos y de calidad pero validados a nivel clínico con muestras como suero, más no con las comúnmente halladas en la escena de un crimen.

En Colombia, actualmente el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, como centro de referencia nacional, se encuentra realizando la técnica de Contrainmunolectroforesis y el FBI, como patrón internacional, emplea la técnica de ABACard p30, técnica validada internacionalmente para este tipo de procedimientos en el área forense y considerada hasta el 2003 como la más sensible en este tipo de muestras. No obstante, el artículo publicado por el Dr. Dale L. Laux de la Oficina de Investigación Criminal de Richfield, Ohio,

compara el ABACard con el Seratec otro kit validado para el área forense, demostrando que el Seractec tiene una mayor sensibilidad y especificidad en estas muestras hasta 72 horas pos coito. **(Rozo, 2014)**

**Importancia del uso y manejo de luces forenses en la escena del delito por parte de los peritos de inspección ocular técnica del departamento de criminalística de pichincha para la determinación orientativa de la presencia de indicios biológicos:** El presente trabajo de grado tiene como importancia principal demostrar la utilidad de los dispositivos de proyección de luz en diferentes longitudes de ondas (Luces Forenses) dentro de la Investigación Científico-Técnica de la escena del delito, escena del crimen, lugar de los hechos; no importa como llamemos al escenario donde se cometió un ilícito. Lamentablemente en la actualidad nuestra unidad de Inspección Ocular Técnica cuenta con luces del tipo antes mencionado, pero no son usadas, debido a la falta de conocimiento y capacitación de los peritos actuantes en la importante labor de recolectar indicios físicos en el espacio que se desarrolló una acción típica antijurídica culpable.

El ser humano tiene la capacidad de mirar los espectros de luz desde los 400 nanómetros a los 720 nanómetros, pero no es todo el espectro existente, debajo de ese rango existen las ondas infrarrojas y superior a este rango se encuentran las ondas ultravioletas. Utilizando estos espectros no observados de forma natural por el hombre y con la ayuda de filtros podemos aprovechar la fluorescencia natural que poseen los indicios orgánicos que normalmente se pueden encontrar en un escenario del delito.

Al hablar de indicios biológicos nos referimos a todos los elementos de convicción dentro de una investigación judicial que han sido localizados dentro de un espacio físico donde se llevó a cabo un hecho posiblemente ilícito, pero que provengan de un ser vivo, como por ejemplo sangre, semen, saliva, sudor, orina, fragmentos óseos, restos dentales, inclusive rastro papilares latentes (palmares, plantares, dactilares) debido a que los elementos biológicos que actúan como tinte para las impresiones papilares tienen también la capacidad de fluorescencia (sudor, urea, sales, minerales, lípidos).

Como antes mencioné en la sección de Inspección Ocular Técnica del Departamento de Criminalística de Pichincha actualmente no se usan estos dispositivos de localización orientativa de indicios biológicos, lo que les obliga a los peritos a realizar una búsqueda minuciosa de manera extrínseca, visual e intuitiva de los elementos indiciarios dentro de la investigación científica del delito, esto significa una pérdida de tiempo y de elementos de convicción que no son encontrados ya que no se los puede ver a simple vista, y contando que no siempre las escenas son de un solo ambiente. **(Quintana, 2015)**

## **2.3. Formulación de la Hipótesis**

### **2.3.1. Hipótesis general**

Existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.

### **2.3.2 Hipótesis específicos**

1. Es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.
2. Es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.
3. Es notoria la alta relación entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.
4. Es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.

## 2.4. Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	INDICES (Reactivos)	ESCALA DE MEDICIÓN
<p><b>VARIABLE 1</b></p> <p><b>APLICANDO LA INMUNOCITOQUIMICA PSA Y CITOQUIMICA PAS</b></p>	<p>García R. (2012).            Inmunocitoquímica o inmunohistoquímica llamada también inmunotinción es un procedimiento Cito-histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar y al que se denomina antígeno. Además, nos dice que estos anticuerpos están unidos a una enzima o esta puede encontrarse unida a un anticuerpo secundario que reconoce y se une al anticuerpo primario. Aplicado a un tejido orgánico o un extendido celular, el anticuerpo primario se une específicamente al sustrato (Tejido viable antigénicamente "fijado en formol o producto citológico fijado en alcohol como también tejido congelado.) y se aprovecha la actividad enzimática para visualizar la unión. El producto originado al actuar la enzima sobre el sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado, al igual que ocurre en todas las reacciones inmunológicas.            Las técnicas Citoquímica e Histoquímicas guardan una estrecha relación y se ocupan de</p>	<p>Martin, I y col (2012).            PSA en inmunohistoquímica es un marcador tumoral específicamente expresado por el epitelio prostático. El PSA está presente en el citoplasma del epitelio benigno y maligno de la próstata. El espermatozoide como célula especializada, flagelada está constituido en sus tres regiones por el antígeno prostático específico PSA y este a su vez facilita que sea observable microscópicamente por la unión antígeno anticuerpo con alta sensibilidad y especificidad del método permitiendo que la inmunocitoquímica sea una prueba confirmatoria en delitos sexuales.            VIGIL, P. (2015)            La tinción ácido periódico de Schiff (PAS) es una de las técnicas de tinción especial más comúnmente realizada en el laboratorio de histopatología que</p>	<p>Antígeno Prostático Específico</p> <p>Acido peryódico de SHIFF</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> <li>• Frotis o extensiones</li> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> <li>• Método empleado (<i>Peroxidasa anti-peroxidasa</i>)</li> <li>• Recuperación del antígeno</li> <li>• Aidez por el antígeno</li> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Alta especificidad</li> <li>• Reproducibilidad</li> <li>• Relación entre la concentración del anticuerpo e intensidad de la reacción</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> <li>• Frotis o extensiones</li> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> <li>• Método químico colorimétrico</li> <li>• Oxidación de los carbohidratos</li> <li>• Formación de los grupos aldehídos</li> <li>• Reacción de mucopolisacaridos</li> <li>• Intensidad de la reacción</li> <li>• Especificidad de la reacción</li> </ul>	<p>Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>

<p style="text-align: center;">VARIABLE 1</p> <p style="text-align: center;">APLICANDO LA INMUNOCITOQUIMICA PSA Y CITOQUIMICA PAS</p>	<p>investigar la actividad química que tiene lugar en las células y los tejidos. Sin embargo estas técnicas son metodologías de <u>trabajo</u> aplicadas por los Citotecnólogos e Histotecnólogos, y consiste en realizar diferentes tinciones a una porción de tejido ó células que se somete a investigación, las tinciones se emplean para <u>poder</u> apreciar las diferentes estructuras que conforman al tejido estudiado y dependiendo de la <u>estructura</u> que se desea investigar es la tinción que se va aplicar.</p>	<p>se utiliza para poner de relieve las moléculas con alto porcentaje de contenido de carbohidratos tales como mucina, glucógeno, microorganismos micóticas, parasitarios y para delimitar la membrana basal en la piel y en otros tejidos especialmente las que contiene mucopolisacaridos Neutros. En nuestro caso, nos sirve de gran utilidad para la visualización de las mucinas MUC1 y MUC8 presentes en la membrana de los espermatozoides químicamente demostrado con el método de PAS.</p>	<p style="text-align: center;">Valoración de la inmunotinción</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad de la reacción</li> <li>• Reproducibilidad</li>   <li>• Característica microscópica del inmunotinción</li> <li>• Presencia de inmunotinción</li> <li>• Ausencia de inmunotinción</li> <li>• Localización celular de la inmunotinción</li> <li>• Localización extracelular de la inmunotinción</li> <li>• Patrón extracelular</li> <li>• Patrón citoplasmático</li> <li>• Interpretación de resultados</li> <li>• Débil en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>• Moderado en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>• Fuerte en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>• Reactividad focal &lt;20% +</li> <li>• Reactividad variable 20 – 80% ++</li> <li>• Reactividad uniforme &gt; 80% +++</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>
---	---	---	---	--	---

<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 1</b></p> <p style="text-align: center;"><b>APLICANDO LA INMUNOCITOQUIMICA PSA Y CITOQUIMICA PAS</b></p>			<p style="text-align: center;"><b>Valoración de la tinción histoquímica</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Característica microscópica de la reacción histoquímica</li> <li>• Presencia de la reacción histoquímica</li> <li>• Ausencia de la reacción histoquímica</li> <li>• Localización celular de la reacción histoquímica</li> <li>• Localización extracelular de la reacción histoquímica</li> <li>• Patrón extraocelular</li> <li>• Patrón citoplasmático</li> <li>• Interpretación de resultados</li> <li>• Débil en cuanto la intensidad de la reacción histoquímica</li> <li>• Moderado en cuanto la intensidad de la reacción histoquímica</li> <li><b>Fuerte en cuanto la intensidad de la reacción histoquímica.</b></li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Politómica (Likert o alternativas múltiples)</b></p>
---	--	--	---	---	--

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	INDICES (Reactivos)	ESCALA DE MEDICIÓN
<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 2</b></p> <p style="text-align: center;"><b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b></p>	<p>Chaves, D. (2014). Las pruebas determinantes de agresión sexual pueden ser orientativas, presuntivas y confirmatorias. Las pruebas orientativas son aquellos estudios de observación macroscópica de las manchas de semen con procedimientos directos e indirectos. Las pruebas presuntivas son aquellas pericias que realizan análisis cualitativos que determinan la presencia de un componente específico del fluido de interés, pero no su concentración. Las pruebas confirmatorias llamadas también específicas o de certeza pueden ser electroforéticas, enzimáticas, inmunocromatográficas y microscópica estas últimas permite la visualización microscópica del espermatozoide ya sea directa o tras una coloración utilizada para su identificación morfológica. El hallazgo de los espermatozoides microscópicamente es una prueba</p>	<p>I.M.L.P. Guía Médico Legal (2012) El objetivo principal del examen biológico es detectar la presencia de semen en las muestras recogidas, como prueba de actividad sexual. El semen tiene dos fracciones: La porción celular o esperma (5% del volumen), y la porción líquida o plasma seminal (95% de volumen). Los espermatozoides son células móviles constituidas por una cabeza, cuello, cuerpo y cola con una longitud que varía de las 50 a 70 micras. Dado que los estudios de semen se realizan principalmente en base a la presencia de espermatozoides, es de cabal importancia el proteger las prendas que contengan a los mismos. En la búsqueda microscópica de espermatozoides en muestras de hisopados (secreción vaginal, anal, bucal), prendas, etc., el método de elección es la tinción citológica "árbol de navidad" (nuclear fast red and picroindigocarmine).</p>	<p>Estudio morfológico del espermatozoide</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Características morfológicas del espermatozoide</li> <li>• Detalle celular de la Cabeza del espermatozoide normal o con defecto morfológico.</li> <li>• Detalle celular del Acrosoma.</li> <li>• Detalle celular del Núcleo-</li> <li>• Detalle celular del citoplasma.</li> <li>• Detalle celular de la membrana citoplasmática.</li> <li>• Detalle celular del Cuello y Porción media del espermatozoide normal o con defecto morfológico</li> <li>• Detalle celular de la Cola o flagelo normal o con defecto morfológico</li> <li>• Espermatozoides morfológicamente completos.</li> <li>• Espermatozoides morfológicamente incompletos.</li> <li>• Grado de celularidad</li> <li>• Células inmaduras</li> </ul>	<p>Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>



<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 2</b></p> <p style="text-align: center;"><b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b></p>	<p>irrefutable de la presencia de semen en una mancha hallado en el espécimen investigado.</p>	<p>Aunque existen otros métodos de tinción descritos:</p> <p>Método de Hematoxilina-Eosina Cristal violeta Método de Papanicolaou Método de Fucsina Alcalina</p>	<p style="text-align: center;">Análisis de Identificación del espermatozoides</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustancias extracelulares del líquido seminal</li> <li>• Estudio microscópico óptico por métodos directos con muestra sin diluir.</li> <li>• Estudio microscópico con contraste de fases.</li> <li>• Estudio microscópico de fluorescencia.</li> <li>• Estudio microscopía electrónica de barrido</li> <li>• identificación de fluido seminal basados en la apariencia de las manchas</li> <li>• Tinciones supra vitales</li> <li>• Tinciones Diferenciales</li> <li>• Tinciones simples colorantes básicos</li> <li>• Tinciones policromática tipo romanowsky</li> <li>• Tinciones policromática diagnostico hematológico</li> <li>• Tinciones citológicas</li> <li>• Tinciones nucleares</li> <li>• Tinción de contraste</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>
--	--	--	---	--	---

<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 2</b></p> <p style="text-align: center;"><b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b></p>			<p style="text-align: center;">muestra Forenses en la escena del crimen</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado vulvar</li> <li>• Hisopado vaginal superior</li> <li>• Hisopado vaginal inferior</li> <li>• Hisopado Orificio cervical externo</li> <li>• Lavado vaginal</li> <li>• Hisopado perianal</li> <li>• Hisopado anal</li> <li>• Hisopado bucal</li> <li>• Lavado bucal</li> <li>• Hisopado de piel</li> <li>• Búsqueda de manchas secas en diferentes tipo de soporte</li> <li>• Búsqueda de manchas liquidas en diferentes tipos de soporte</li> <li>• Búsqueda de costra en diferentes tipos de soporte</li> <li>• Ropa interior de la víctima</li> <li>• Ropa interior del sospechoso</li> <li>• Prendas de vestir</li> <li>• Papel higiénico o toallas</li> <li>• Diferentes tipos de soporte textil.</li> <li>• Objetos de transporte pequeños</li> <li>• Diferentes tipos de superficie.</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>
--	--	--	---	---	---

Fuente: Elaborado por el autor

## 2.5. Descripción de términos básicos

- **Antígenos:** Es la molécula que queremos detectar. Sustancia, que, inoculada en un animal, es capaz de desencadenar una respuesta inmunológica con expresión humoral y/o celular. Sus propiedades inmunológicas son: inmunogenicidad (capacidad de producir una respuesta específica bien humoral y/o celular), antigenicidad (capacidad de combinarse con anticuerpos y/o con receptores de células), alergenidad (capacidad de producir reacción alérgica). Sus propiedades inmunológicas son: inmunogenicidad (capacidad de producir una respuesta específica bien humoral y/o celular), antigenicidad (capacidad de combinarse con anticuerpos y/o con receptores de células), alergenidad (capacidad de producir reacción alérgica).
- **Haptene:** Molécula capaz de reaccionar específicamente con un Ac pero no de inducir su síntesis para lo cual es necesario que se una con una proteína.
- **Determinante Antigénica:** Las moléculas del Ag no presentan antigenicidad homogénea sino que poseen pequeñas áreas responsables de la especificidad que se denominan determinantes antigénicas o epitopes.
- **Interacción antígeno-anticuerpo:** se estabiliza mediante enlaces débiles, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waal e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y la suma de todos estos enlaces genera una interacción estable entre el lugar de unión del anticuerpo (paratope) y el lugar de unión del antígeno (epitope), estas fuerzas son inversamente proporcionales a una potencia de la distancia entre los grupos interactuantes, lo que implica que epitope y paratope deben presentar estructuras complementarias para obtener una energía de unión suficiente como para resistir la disrupción termodinámica y la suma de estas fuerzas de atracción y de repulsión se conoce como afinidad del anticuerpo.

- **Epítomos:** Son cada uno de los sitios discretos de una macromolécula reconocidos individualmente por un anticuerpo específico o por un TCR (receptor de linfocitos T) específico. Son regiones inmunológicamente activas.
- **Anticuerpos:** La capacidad de reconocimiento específico de cualquier tipo de molécula o partícula extraña por parte del sistema inmune, es posible gracias a que cuenta con las inmunoglobulinas (Ig) y con los receptores de los linfocitos T (TCR), los cuales poseen las cualidades de diversidad, heterogenicidad y procedencia a partir de reordenaciones de genes.
- **Anticuerpos policlonales:** Son aquellos que proceden de distintos clones de linfocitos B estimulados.
- **Anticuerpos monoclonales:** Son aquellos que derivan de un solo clon de linfocitos B y son específicos para un epítome determinado, constituyendo una población homogénea.
- **La interacción Ag-Ac se verifica en tres niveles:**
  1. La reacción primaria que consiste en el evento básico durante el cual se unen las moléculas del Ag con las del Ac en un proceso no visible. Se unen el epítome del Ag con el paratope del Ac.
  2. La reacción secundaria que es un fenómeno visible como la aglutinación o la precipitación *in vitro*.
  3. La reacción terciaria es un conjunto de fenómenos biológicos (*in vivo*) y que son consecuencia de las reacciones primarias y secundarias.

Las reacciones IHQ son primarias, se hacen visibles marcando el anticuerpo secundario.

- Elementos particulados: oro coloidal, ferritina, proteína A-oro (ME)
- Fluorocromos: rhodamina, fluoresceína, FICT
- Enzimas: peroxidasa, glucosa-oxidasa, fosfatasa
- Otros: Proteína A, avidina-biotina, faloidina, etc.

- **Colores y Moléculas Colorantes.**

**García R. (1995).** Conceptualiza que, de forma genérica, todos los tejidos de origen animal son incoloros salvo que contengan algún tipo de pigmento, en cuyo caso adoptan el color que aquél les proporciona.

El fundamento de cualquier método de tinción radica en la propiedad que poseen todos los tejidos para incorporar y fijar de modo variable diversas sustancias coloreadas llamadas colorantes.

Un colorante puede definirse como una sustancia que, puesta en contacto con un soporte adecuado, se une a él de forma perdurable transmitiéndole su color.

- **Tipos de colorantes**

En función de su origen, se distinguen dos tipos fundamentales de colorantes: naturales y artificiales.

- **Los colorantes naturales:** son relativamente escasos y se obtienen en forma de extractos a partir de ciertas plantas o insectos. En la histología de rutina son ampliamente utilizados, siendo los más conocidos como colorantes nucleares la hematoxilina y el carmín, y como colorantes citoplasmáticos, la safranina y la Orceína.

- **Los colorantes artificiales:** son derivados de la anilina que constituye la base de numerosas coloraciones histológicas. Aunque inicialmente se obtiene a partir del alquitran de carbón, en la actualidad se sintetizan en el laboratorio.

- **Naturaleza química de los colorantes:** Cromóforos, Cromógenos y Auxócromos.

El origen químico de todos los colorantes es la molécula de BENCENO que se presenta en forma de "Anillo Aromático", conformada por 6 átomos de carbono, 3 enlaces simples y 3 enlaces dobles. Estos Anillos Aromáticos de Benceno presentan enlaces dobles inestables entre sus átomos de carbono y pueden ser reordenados lo que da origen a la gran diversidad de colorantes.

**EI BENCENO** es una sustancia incolora pero que si al reaccionar con “Radicales Químicos” logra la fijación de sus dobles enlaces, puede absorber y reflejar radiación luminosa (fotones) y mostrar color.

Los Radicales Químicos se denominan “**GRUPOS CROMÓFOROS**”

Los Radicales Químicos que fijan los dobles enlaces de la molécula de Benceno originando que esta muestre color se denominan “GRUPOS CROMÓFOROS”. Cuando los dobles enlaces de un “Anillo Aromático de Benceno” se encuentran fijados por los GRUPOS CROMÓFOROS, se forma una nueva molécula con capacidad de mostrar color denominada: **CROMÓGENO**.

EI CROMÓGENO no es un COLORANTE.

EI CROMÓGENO tiene la capacidad de mostrar color, pero no tiene la capacidad de unirse a los tejidos.

EI COLORANTE tiene la capacidad de mostrar color, y también tiene la capacidad de unirse a los tejidos.

Las moléculas que permiten la fijación del CROMÓGENO a los tejidos se denominan: GRUPOS AUXOCROMOS. Los GRUPOS AUXOCROMOS convierten un CROMÓGENO en un COLORANTE. Los GRUPOS AUXOCROMOS son cargas eléctricas Positivas o Negativas.

## **CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS GRUPOS CROMOFOROS**

A) Nitrados: Presenta el Cromóforo Nitro ( $-\text{NO}_2$ ) en el Anillo derivado del Benceno. Ejemplo: **Ácido Pítrico**.

B) Azoicos: Presenta el Cromóforo Azóico ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) vinculando Anillos adyacente derivados del Benceno. Pueden ser Monoazóicos o Diazóicos

Ejemplo: **Orange G (Monoazóico) y Rojo Congo (Diazóico)**.

C) Derivados de la Antraquinona: Presenta el Cromóforo Carbonilo ( $>\text{C}=\text{O}$ ) en un producto de la oxidación del Antraceno. Ejemplo: **Rojo de Alizarina S**.

D) Derivados de la Acridina: Presenta el Cromóforo Imino ( $>\text{C}=\text{N}$ ) en un producto de la nitración del Antraceno. Ejemplo: **Naranja de Acridina**.

E) Derivados de la Imina Quinónica: Presenta dos Cromóforos y pueden ser de 3 tipos: Oxacínicos: Grupo Imino ( $>C=N$ ) y Carbonilo ( $>C=O$ ), ejemplo: Violeta de Cresilo Tiacínicos: Grupo Imino ( $>C=N$ ) y Tiazólico ( $>C=S$ ), ejemplo: Azul de Metileno Acínicos: Grupo Imino ( $>C=N$ ) e Imino ( $>C=O$ ), **Ejemplo: Safranina.**

F) Derivados del Trifenilmetano: Presenta el Cromóforo ( $>C=NH$ ) en un producto de la nitración del Antraceno. **Ejemplo: Light Green.**

G) Derivados del Xanteno: Presenta el Cromóforo Carbonilo ( $>C=O$ ) en un producto de la nitración del Antraceno. **Ejemplo: Eosina Yellow.**

H) Derivados de la Ftalocianina: Presenta el Cromóforo Imino ( $>C=N$ ) uniendo 4 grupos Isoindol (Benceno + Pirrol) en cuyo centro se ubica un átomo metálico. **Ejemplo: Alcian Blue.**

## CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS GRUPOS AUXOCROMOS

- **Colorantes básicos.**

Son aquellos productos por unión entre un Cromógeno débilmente Ácido (-) con Grupos Auxócromos fuertemente Básicos (+) que le confieren carga global positiva al colorante. Tiñen estructuras ácidas contenidas mayormente en los núcleos celulares. Por ejemplo, la Hematoxilina, Fucsina Básica, etc.

- **Colorantes ácidos.**

Son aquellos productos de la unión entre un Cromógeno débilmente Básico (+) con Grupos Auxócromos fuertemente Ácidos (-) que le confieren carga global negativa al colorante. Tiñen estructuras básicas contenidas mayormente en los citoplasmas celulares.

- **Colorantes neutros.**

Son aquellos productos de la unión entre un Colorante Ácido y uno Básico en disolución alcohólica lo que les permite formar una asociación estable confiriéndole carga global neutra al colorante. Tiñen estructuras ácidas o básicas cuando los colorantes son disociados al inestabilizarlos con agua.

- **Colorantes indiferentes.**

Son aquellos cuyo mecanismo de tinción no depende de las cargas ácidas o básicas. Por ejemplo: Impregnación, Inmunohistoquímica, etc.

- Colorantes metacromáticos.

En condiciones normales, la mayor parte de los tejidos tienden a teñirse con una tonalidad semejante a la del colorante utilizado para su demostración. A esta demostración se le conoce con el nombre de ortocromasia. Sin embargo, cuando se utilizan ciertos colorantes básicos derivados de la anilina, algunas estructuras tisulares se tiñen de color totalmente distintos, este efecto se conoce con el nombre de metacromasia y las estructuras así teñidas, cromótopas. Los colorantes metacromáticos son sustancias químicamente puras y no de carácter salino.

- **Mecanismos generales de la coloración.**

Según la naturaleza de la vinculación molecular entre los colorantes y los tejidos, existen tres mecanismos generales: de carácter físico, fisicoquímico o Histoquímico. Estos mecanismos combinados entre sí en distinta medida explican las particularidades de las principales técnicas de tinción en anatomía patológica.

Los mecanismos de carácter puramente físico están ligados a las propiedades de disolución e impregnación del colorante sobre el tejido. Las tinciones ligadas a un mecanismo principalmente químico están basadas en el desarrollo de una reacción química entre el colorante y la estructura objeto de tinción de forma que al interaccionar ambos se produce un nuevo cromógeno responsable del color obtenido. Al conjunto de procedimientos técnicos que se fundamentan en este mecanismo común se agrupan dentro de la histoquímica.

Los mecanismos fisicoquímicos de coloración tisular están vinculados a la formación de uniones intermoleculares por atracción electrostática o por fuerza de tensión superficial.



## **CAPÍTULO III:**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Tipo de investigación**

El presente trabajo de investigación, según la clasificación de Sánchez y Reyes (2006), está enmarcado dentro del tipo de investigación aplicada, ya que describe, explica la influencia o relación entre las variables de investigación en la realidad concreta del universo la cual se caracteriza por su interés en la aplicación de los conocimientos teóricos a determinada situación y las consecuencias prácticas que de ellas se deriven. (Sánchez y Reyes, 2006).

#### **3.2. Diseño de la Investigación**

El nivel de investigación es correlacional, el tipo de diseño de investigación es no experimental en la que los investigadores miden dos variables y establecen una relación estadística entre las mismas (correlación), sin necesidad de incluir

variables externas para llegar a conclusiones relevantes. (H. Hernández Sampieri, 1998, p. 184).

Los estudios correlacionales comprenden aquellos estudios en los que se tiene interés en descubrir o aclarar las relaciones existentes entre las variables más significativas, mediante el uso de los coeficientes de correlación. Estos coeficientes de correlación, son indicadores matemáticos que aportan información sobre el grado, intensidad y dirección de la relación entre variables. (Gordillo, 2010, p.8).

Su diseño se representa así:

**M1: Ox r Oy**

Donde:

M1: Muestra de estudio

Ox: Aplicando la Inmunocitoquímica PSA Y Citoquímica PAS

Oy: Reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses

r: índice de correlación

### **3.2 Población y muestra**


Para la investigación, se dispuso de una población conformada de 112 casos. El trabajo aplicativo consta de dos partes: El primero, la recolección de las muestras en el servicio de Ginecología, relacionadas a violencia sexual. En segundo lugar, las muestras correspondientes del servicio de Microbiología obtenidas para el estudio de fertilidad, una vez concluido su evaluación por el personal encargado las muestras son utilizadas el mismo día para nuestro estudio correspondiente a la evaluación de diferentes prendas de vestir (algodón y sintéticas) incluyendo además diferentes soportes como papel higiénico ó toallas. Ambas muestras serán estudiadas para determinar la relación que existe entre la

aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren.

La muestra aplicada en esta investigación es de tipo probabilístico presentando un tamaño de muestra de 87 casos. Las muestras concluyen en láminas procesadas con los métodos Inmunocitoquímica s PSA y Citoquímicas PAS. Finalmente se invitó a expertos Tecnólogos Médicos donde, se les entregó personalmente una carta con la invitación formal a participar en la evaluación de las láminas procesadas para el estudio microscópico, comunicándoles el objetivo del proyecto, la población a la que se dirigía y especificaciones de la investigación; como de la confidencialidad, sensibilidad y especificidad de los resultados y sus respuestas. (Ver Anexo 4)

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot (p \cdot q)}{N \cdot E^2 + Z^2 (p \cdot q)}$$

Figura 16. Fórmula para el cálculo de la muestra. Variable cualitativa población finita. Fuente: *Elaboración y evaluación de proyectos y trabajos de investigación. Universidad Inca Garcilazo de la Vega. 2015*



**Calculadora de Muestras**

Margen de error: 10% ▼  
 Nivel de confianza: 99% ▼  
 Tamaño de Población: 100  
 Calcular

**Margen: 5%**  
**Nivel de confianza: 99%**  
**Población: 100**

**Tamaño de muestra: 87**

**Ecuación Estadística para Proporciones poblacionales**

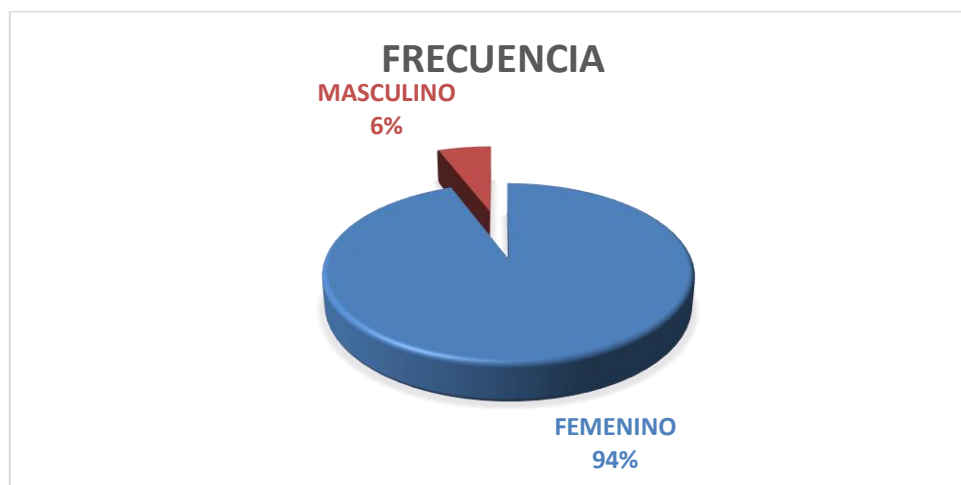
n= Tamaño de la muestra  
 Z= Nivel de confianza deseado  
 p= Proporción de la población con la característica deseada (éxito)  
 q= Proporción de la población sin la característica deseada (fracaso)  
 e= Nivel de error dispuesto a cometer  
 N= Tamaño de la población

$$n = \frac{z^2(p \cdot q)}{e^2 + \frac{z^2(p \cdot q)}{N}}$$

Figura 17. Calculadora de muestra Fuente: *Asesoría económica y Marketing. Recuperado el 15 de Enero 2018* [http://www.corporacionaem.com/tools/calc\\_muestras.php](http://www.corporacionaem.com/tools/calc_muestras.php)

## MUESTRAS REPRESENTATIVAS DE ESTUDIOS DE VÍCTIMAS DE AGRESIÓN SEXUAL POR GÉNERO ENERO - AGOSTO DEL 2017

**Grafico2.** Grafico circular de muestras representativas de estudio de víctimas de agresión sexual por género de enero – agosto 2017



**Tabla10.**

Tabla de muestra de estudio de víctimas de agresión sexual por género de Enero – Agosto 2017

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
FEMENINO	82	94
MASCULINO	5	6
TOTAL	87	100

**Fuente:** Datos obtenidos en el H.A.S.S.

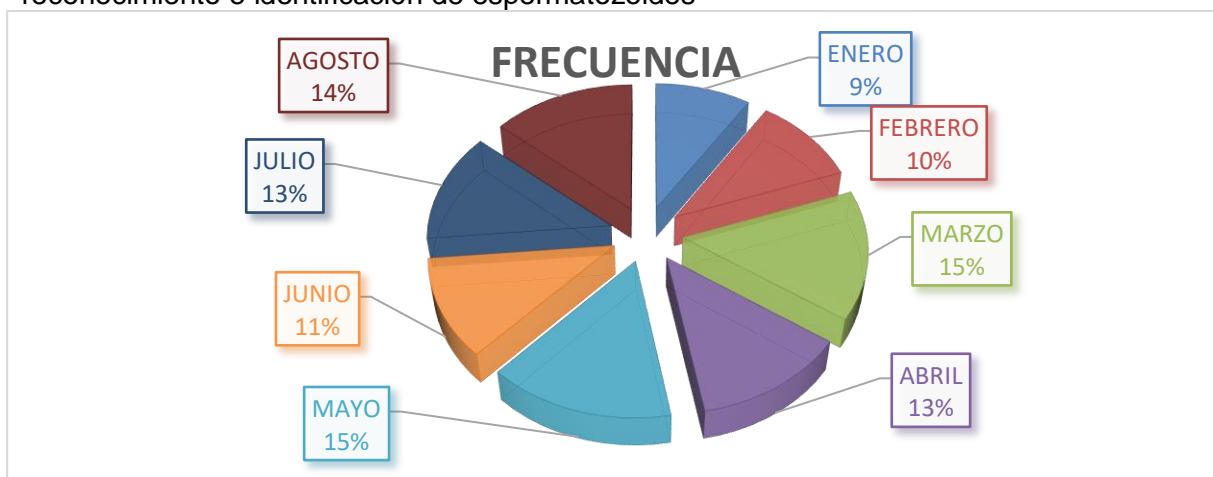
**Elaborado por:** Lic. Carlos Hugo García Vásquez. Licenciado Tecnólogo Médico con Especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

### INTERPRETACIÓN:

Según el gráfico interpretamos que el género más vulnerable de sufrir agresiones sexuales es el Femenino con una incidencia del 94%.

**Muestras representativas de estudios forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren ENERO - AGOSTO del 2017**

**Grafico 3.** Grafico circular de muestras representativas de estudios forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides



**Tabla 11.**

Tabla de Muestras de estudios representativos forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
ENERO	8	9
FEBRERO	9	10
MARZO	13	15
ABRIL	11	13
MAYO	13	15
JUNIO	10	11
JULIO	11	13
AGOSTO	12	14
TOTAL	87	100

Fuente: Datos obtenidos en el H.A.S.S.

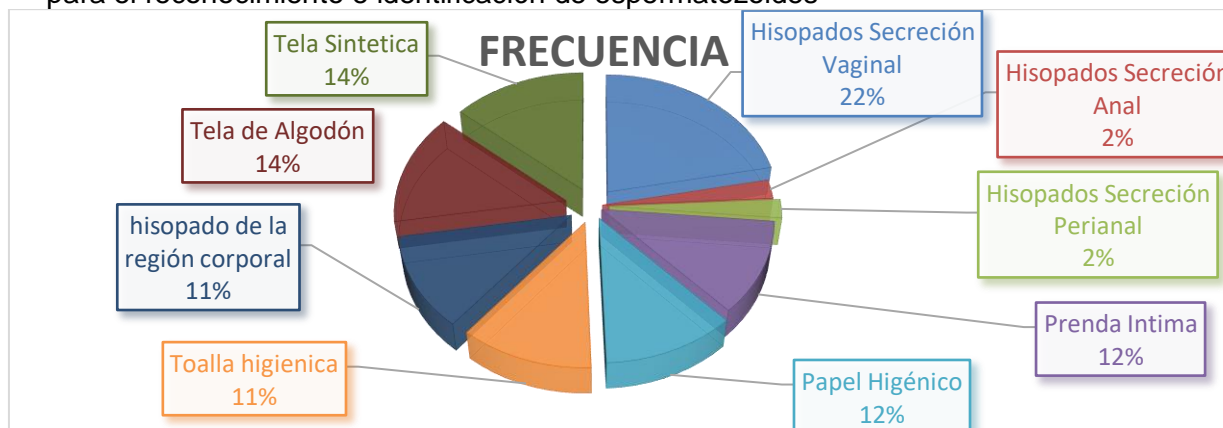
Elaborado por: Lic. Carlos Hugo García Vásquez. Licenciado Tecnólogo Médico con especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

**INTERPRETACIÓN:**

Según el gráfico interpretamos el total de muestras de estudios forenses analizadas es de 87, deduciendo en marzo y julio se han realizado la mayor cantidad de pruebas aplicando la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en las muestras de estudio.

**Tipos de muestras representativas de estudio forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren ENERO - AGOSTO del 2017**

**Grafico 4.** Grafico circular de tipos de muestras representativas de estudio forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides



**Tabla 12.**

Tabla de tipos de muestras representativas de estudio forenses analizadas para la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides

Alternativa	Frecuencia	%
Hisopados Secreción Vaginal	19	22
Hisopados Secreción Anal	2	2
Hisopados Secreción Perianal	2	2
Prenda Intima	10	12
Papel Higiénico	10	12
Toalla higiénica	10	11
hisopado de la región corporal	10	11
Tela de Algodón	12	14
Tela Sintética	12	14
<b>TOTAL</b>	<b>87</b>	<b>100</b>

Fuente: Datos obtenidos en el H.A.S.S.

Elaborado por: Lic. Carlos Hugo García Vásquez. Licenciado Tecnólogo Médico con especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

**INTERPRETACIÓN:**

Según el gráfico interpretamos el total de muestras forenses analizadas es de 87, deduciendo que los hisopados Secreción Vaginales que representan 22% de las muestras procesadas son las muestras de mayor cantidad que se ha aplicado la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en las muestras de estudio.

### 3.4 Técnicas e instrumentos

#### 3.4.1 Descripción del Instrumento

Se elaboró un cuestionario que se tituló: Aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual, dirigido a los Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica.

Este contiene: presentación, datos de puntuación, la edad y el sexo del participante y las dimensiones. El instrumento completo se puede ver en el **Anexo 5**

En la presentación se explica el objetivo y naturaleza de la investigación y el compromiso de confidencialidad, sensibilidad y especificidad de los resultados y sus respuestas de los datos suministrados. La estructura del instrumento consta de un conjunto de ítems presentados en forma de afirmaciones distribuidas en cuatro dimensiones que corresponden a la aplicación de la Inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS en víctimas por violencia sexual: Marcador Inmunocitoquímico Antígeno Prostático Específico (PSA), Técnica Citoquímica Ácido peryódico de SHIFF (PAS), Valoración citológica de los Espermatozoides con el método de Inmunocitoquímica PSA, Valoración citológica de los Espermatozoide con el método de Citoquímica PAS). Y tres dimensiones que corresponden al reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses: Estudio morfológico del espermatozoide por microscopía, El procesamiento de obtención de muestras del líquido seminal en diferentes zonas anatómicas de las víctimas relacionadas a violencia sexual para la identificación de los espermatozoides como también muestras Forenses en la escena del crimen, donde se evaluó en distintas prendas de vestir (de algodón y sintéticas) incluyendo además diferentes soportes como papel higiénico ó toallas . Cada una de las dimensiones se presentó en una escala tipo Likert de cinco grados, donde los evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, expresan su grado de acuerdo o desacuerdo. (**Tabla 13**)

Tabla 13.  
Escala Tipo Likert

1	2	3	4	5
Indeciso	Totalmente en desacuerdo	En desacuerdo	De acuerdo	Totalmente de acuerdo

Fuente: Elaborado por el investigador de la tesis

### 3.4.2 Validación del instrumento

Para la aplicación del instrumento, se conservaron las mismas condiciones para todos los evaluadores, la presentación del objetivo de la investigación a la población a quien es dirigida, con el objeto de que los Tecnólogos Médicos Especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, estuviesen en disposición para aplicación del instrumento, seguidamente se entregó el cuestionario impreso, se explicaron las instrucciones, se aclararon dudas y se solicitó que contestaran la totalidad de sus preguntas.

Todos los cuestionarios fueron aplicados en su correspondiente servicio, teniendo en cuenta la disposición de cada una de ellas, porque la ubicación de los servicios no eran las mismas y el horario de los establecimientos era variado. Las condiciones dadas por los colegas fueron de apertura y disposición para la aplicación de los cuestionarios después de haber observado microscópicamente las láminas procesadas por el método Inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS; donde el coordinador del servicio facilitó el espacio físico, la disponibilidad de los Tecnólogos Médicos y el cumplimiento en el desarrollo de los cuestionarios en su totalidad.

El procedimiento de validación del instrumento, se inició con una revisión bibliográfica y evaluación microscópica de las láminas procesadas por el método Inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS, que permitió comprender y elaborar un antecedente académico pertinente y actualizado sobre el tema; donde se llegó a construir un marco teórico propio, que fue parte fundamental para el desarrollo de las dimensiones y preguntas necesarias para la conformación del cuestionario, documento titulado: Instrumento para la recolección de datos. **(Anexo 3)**.



El cuestionario realizado fue revisado por un panel de expertos compuesto por 3 Magister en Educación y Salud incluyendo además la evaluación microscópica de las láminas procesadas por el métodos Inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS , a quienes se les envió una carta de presentación, matriz de operacionalización de variables, matriz del instrumento para la recolección de datos y el certificado de validez de contenido del instrumento que le permitía analizar cada uno de los ítems en cuanto a su pertinencia al constructo analizado, claridad de su redacción y pertinencia de los ítems a las dimensiones que habían sido definidas teóricamente. Con base en las observaciones registradas por cada juez experto, se realizaron modificaciones a los ítems en cuanto a redacción y se obtuvo la versión final compuesta por 24 ítems, documento titulado: Certificado de validez de contenido del instrumento que mide la “Aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual”. **(Anexo 4).**

## CAPÍTULO IV.

### PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

#### Alfa de Cronbach



Figura 18. Escala análisis de consistencia

*Fuente: Cálculo e interpretación del Alfa de Cronbach para el caso de validación de la consistencia interna de un cuestionario, con dos posibles escalas tipo Likert. . Revista Publicando, 2(1). 2015, 62-77. Autor: Jorge A. González Alonso. Mauro Pazmiño. Santacruz.*

**Tabla 14.**

Tabla de escala de fiabilidad de Alfa de Cronbach

Alfa de Cronbach	Consistencia interna
$\alpha \geq 0.9$	Excelente
$0.9 > \alpha \geq 0.8$	Bueno
$0.8 > \alpha \geq 0.7$	Aceptable
$0.7 > \alpha \geq 0.6$	Cuestionable
$0.6 > \alpha \geq 0.5$	Pobre
$0.5 > \alpha$	Inaceptable

*Fuente: Cálculo e interpretación del Alfa de Cronbach para el caso de validación de la consistencia interna de un cuestionario, con dos posibles escalas tipo Likert. . Revista Publicando, 2(1). 2015, 62-77. Autor: Jorge A. González Alonso. Mauro Pazmiño. Santacruz.*

## 4.1. Procesamiento de datos

### 4.1.1. Validación de contenido de las variables

La prueba binomial para las variables se detalla en la siguiente tabla:

**Tabla 15.**  
Prueba binominal para las variables

		Prueba binomial				
		Categoría	N	Proporción observada	Prop. de prueba	Sig.exacta (bilateral)
ASCARZA	Grupo 1	SI	24	1,00	,50	,001
	Total		24	1,00		
QUISPE	Grupo 1	SI	24	1,00	,50	,001
	Total		24	1,00		
PALACIOS	Grupo 1	SI	24	1,00	,50	,001
	Total		24	1,00		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.

P Promedio = 0.001

P promedio < 0-05

La prueba binomial indica que el instrumento de medición de la variable dependiente es válido en su contenido porque el resultado es menor al nivel de significancia de 0.05

#### 4.1.2. Escala: confiabilidad del instrumento de medición

##### a). Para la Variable 1.

**Tabla. 16.**

Escala: confiabilidad del instrumento de medición

Resumen del procesamiento de los casos

		N	%
Casos	Válidos	87	96,7
	Excluidos	3	3,3
	Total	90	100,0

a. Eliminación por lista basada en todas las variables del procedimiento.

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.

**Tabla. 17.**

Alfa de Cronbach Variable 1.

Estadísticos de fiabilidad

Alfa de Cronbach	N de elementos
,948	14

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.

#### Interpretación

De acuerdo a los resultados de fiabilidad que son de 0.940 según la tabla categórica se determina que el instrumento de medición es de consistencia interna con tendencia a ser muy alta.

**b. Para la Variable 2.**

**Tabla. 18.**

Escala: confiabilidad del instrumento de medición

Resumen del procesamiento de los casos

		N	%
Casos	Válidos	87	96,7
	Excluidos <sup>a</sup>	3	3,3
	Total	90	100,0

a. Eliminación por lista basada en todas las variables del procedimiento.

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.

**Tabla. 19.**

Alfa de Cronbach Variable 2

Estadísticos de fiabilidad

Alfa de Cronbach	N de elementos
,950	10

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.

**Interpretación**

De acuerdo a los resultados de fiabilidad que son de 0.950 según la tabla categórica se determina que el instrumento de medición es de consistencia interna con tendencia a ser muy alta.

#### **4.1.3. Análisis estadístico**

Se calcularon los puntajes de las dimensiones de la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS a partir del promedio de los ítems de cada dimensión. A menor puntaje mayor acuerdo en la aplicación de estas dimensiones evaluadas en el laboratorio de procedimiento de estudio analítico. El puntaje se calculó tomando el promedio de los 10 ítems relacionados con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual. A menor puntaje se considera que la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS por microscopía óptica es confirmatorio para comprobar un delito sexual.

La fiabilidad se evaluó calculando el alpha de Chronbach. Se presentaron medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas. Para las variables cualitativas se calcularon frecuencias absolutas y relativas. La correlación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman y su valor de p. La influencia de la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual se determinó mediante modelos lineales generalizados simples y múltiples. Se calcularon coeficientes beta, intervalos de confianza y valor de p. El nivel de significancia usado fue 0.05 y el software empleado fue IBM SPSS Statistics versión 24.0.

## APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS

Dimensión: Marcador Inmunocitoquímico Antígeno Prostático Específico (PSA)

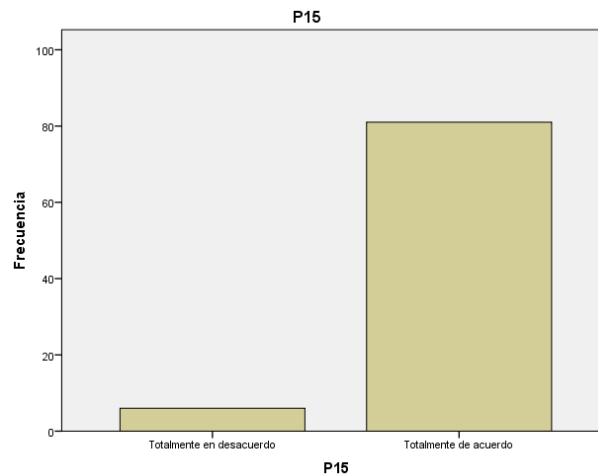
1. ¿Existe forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 20.**

Análisis estadístico de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P15				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos				
Totalmente en desacuerdo	6	6,7	6,9	6,9
Totalmente de acuerdo	81	90,0	93,1	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos				
Sistema	3	3,3		
Total	90	100		
				,0

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.



**Gráfico 5.** Gráfico de barras de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

### Interpretación:

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 93.1 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 6.9 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.



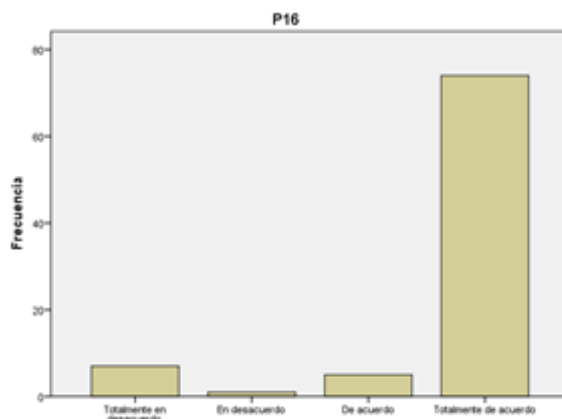
2. ¿Existe forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 21.**

Análisis estadístico de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual

P16				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	7	7,8	8,0	8,0
En desacuerdo	1	1,1	1,1	9,2
Válidos De acuerdo	5	5,6	5,7	14,9
Totalmente de acuerdo	74	82,2	85,1	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 6.** Gráfico de barras de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 85,1 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 5.7 % de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en desacuerdo 1.1 % y totalmente en desacuerdo 8.0 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

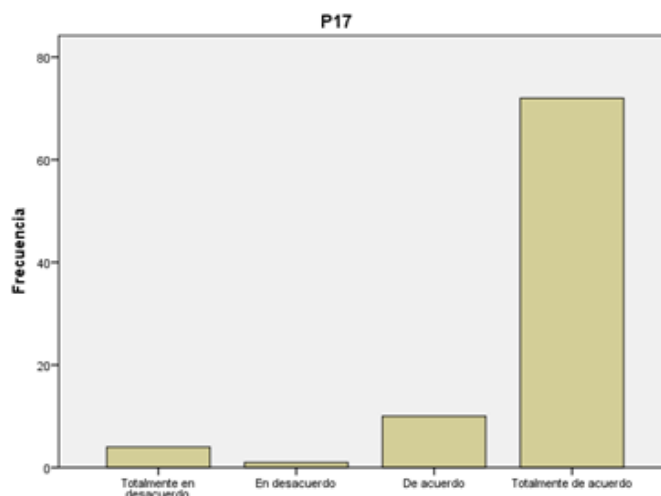
3. ¿Existe diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 22.**

Análisis estadístico de la diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P17				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6	4,6
En desacuerdo	1	1,1	1,1	5,7
Válidos De acuerdo	10	11,1	11,5	17,2
Totalmente de acuerdo	72	80,0	82,8	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 7.** Gráfico de barras de la diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el grafico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 82,8 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 11.5 % de diferenciar entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en desacuerdo 1.1% y totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

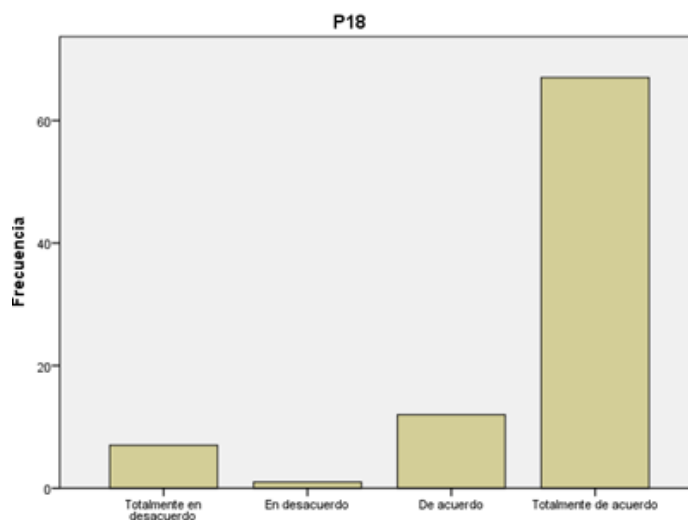
4. ¿La aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente?

**Tabla 23.**

Análisis estadístico de la aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente.

P18				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	7	7,8	8,0	8,0
En desacuerdo	1	1,1	1,1	9,2
Válidos De acuerdo	12	13,3	13,8	23,0
Totalmente de acuerdo	67	74,4	77,0	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 8.** Gráfico de barras de la aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 77,0 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 13.8 % de la aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente. Asimismo, están en desacuerdo 1.1% y totalmente en desacuerdo 8.0 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

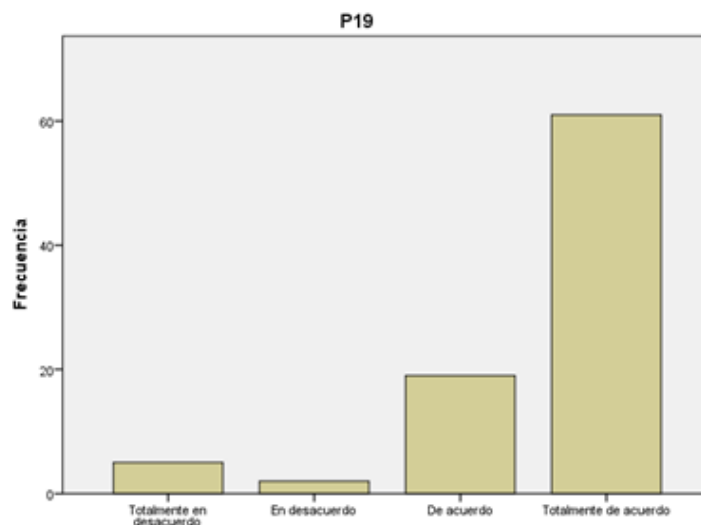
5. ¿Existe forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 24.**

Análisis estadístico de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P19				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
	Totalmente en desacuerdo	5	5,6	5,7
	En desacuerdo	2	2,2	8,0
Válidos	De acuerdo	19	21,1	29,9
	Totalmente de acuerdo	61	67,8	100,0
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
Total		90	100,0	

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 9.** Gráfico de barras de la forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 70,1 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 21,8 % de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en desacuerdo 2,3% y totalmente en desacuerdo 5,7 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

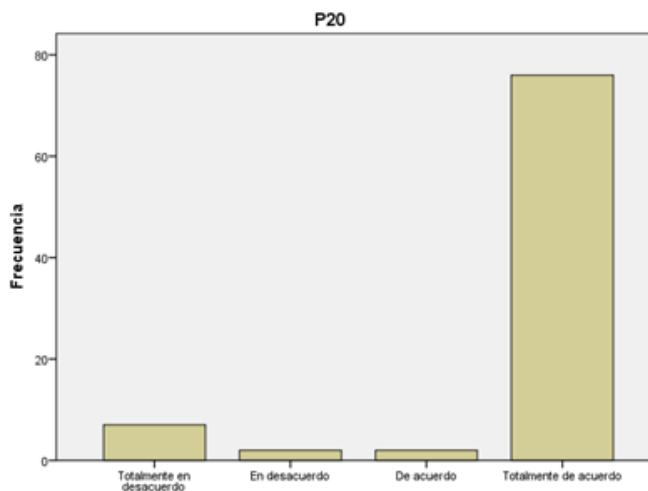
6. ¿Existe forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 25.**

Análisis estadístico de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P20				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	7	7,8	8,0	8,0
En desacuerdo	2	2,2	2,3	10,3
Válidos De acuerdo	2	2,2	2,3	12,6
Totalmente de acuerdo	76	84,4	87,4	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 10.** Gráfico de barras de la forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 87,4 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 2.3 % de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en desacuerdo 2.3% y totalmente en desacuerdo 8.0 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

**Dimensión: valoración citológica de los Espermatozoides con el método de Inmunocitoquímica PSA**

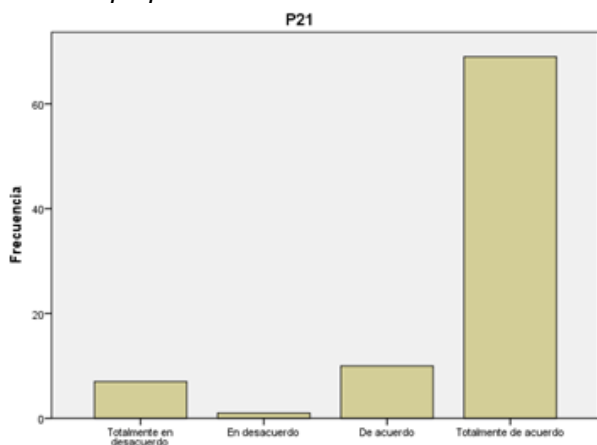
7. ¿Existe la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 26.**

Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P21				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	7	7,8	8,0	8,0
En desacuerdo	1	1,1	1,1	9,2
Válidos De acuerdo	10	11,1	11,5	20,7
Totalmente de acuerdo	69	76,7	79,3	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 11.** Gráfico de barras de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 79,3 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 11,5 % de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en desacuerdo 1,1% y totalmente en desacuerdo 8,0 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

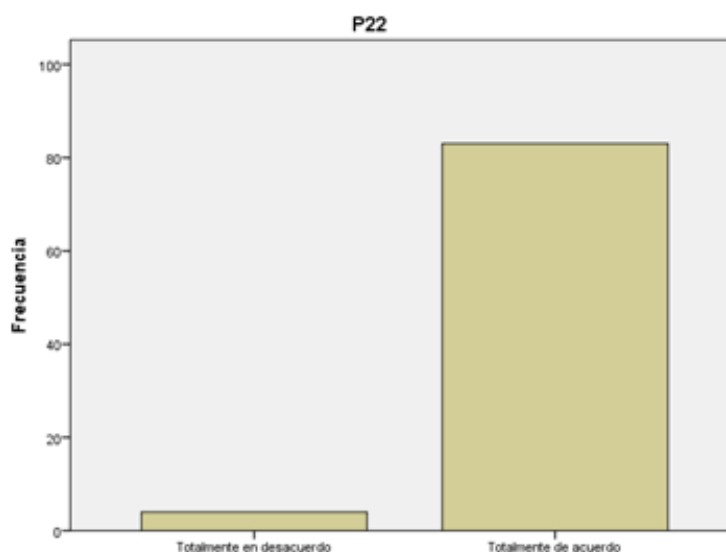
8. ¿Existe la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 27.**

Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P22				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
	Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6
Válidos	Totalmente de acuerdo	83	92,2	100,0
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
Total		90	100	,0

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 12.** Gráfico de barras de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el grafico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 95.4 % de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

**Dimensión: Valoración citológico del espermatozoide con el método de Citoquímica PAS**

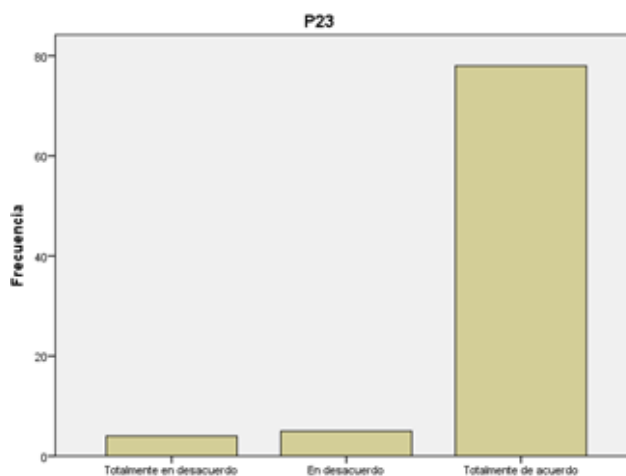
9. ¿Existe la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la citoquímica PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 28.**

Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la citoquímica PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

P23				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6
	En desacuerdo	5	5,6	10,3
	Totalmente de acuerdo	78	86,7	89,7
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
	Total	90	100,0	

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 13.** Gráfico de barras de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la citoquímica PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 89,7 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en desacuerdo 5.7% y totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.



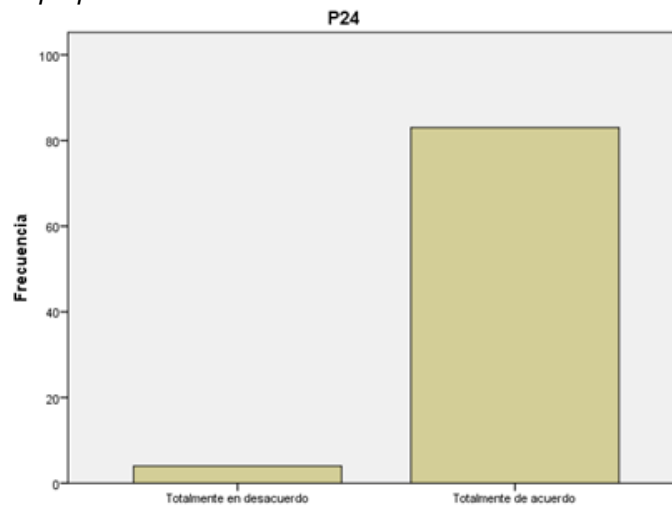
10. ¿Existe la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?

**Tabla 29.**

Análisis estadístico de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

		P24			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6	4,6
	Totalmente de acuerdo	83	92,2	95,4	100,0
	Total	87	96,7	100,0	
Perdidos	Sistema	3	3,3		
Total		90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 14.** Gráfico de barras de la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 95.4 % de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio

## Reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses

### Dimensión: Estudio morfológico del espermatozoide por microscopía

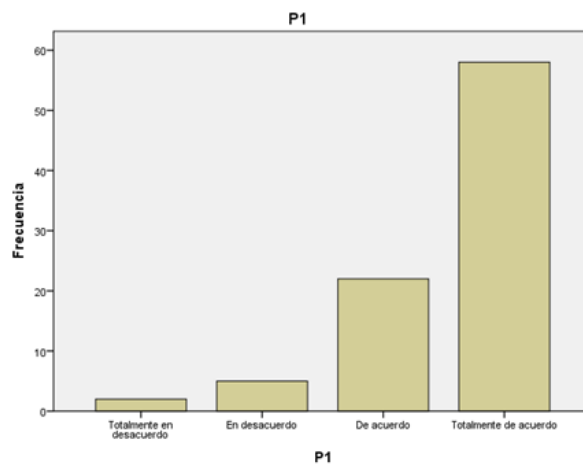
11.- ¿Existe forma de verificar el reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopia en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 30**

Análisis estadístico de verificar el reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopia en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P1				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	2	2,2	2,3	2,3
En desacuerdo	5	5,6	5,7	8,0
Válidos De acuerdo	22	24,4	25,3	33,3
Totalmente de acuerdo	58	64,4	66,7	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0.



**Gráfico 15.** Gráfico de barras de verificar el reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopia en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

#### Interpretación:

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 66,7 % de ellos indican que las muestra en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 25,53 % de acuerdo de verificar el reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopia al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en desacuerdo 5.6 % y totalmente en desacuerdo 2.2% con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

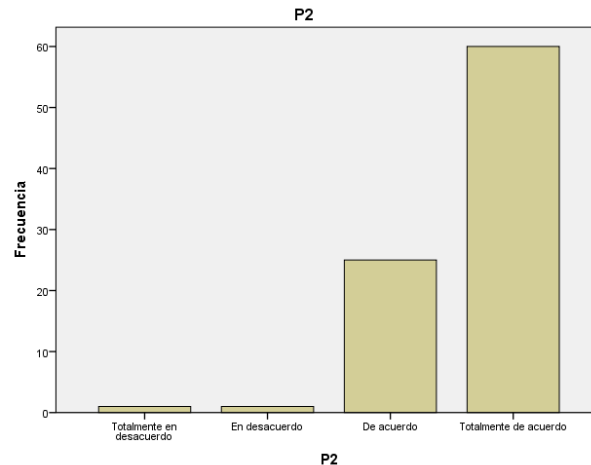
12. ¿La observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen *microscopia* en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 31.**

Análisis estadístico de la observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P2				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	1	1,1	1,1	1,1
En desacuerdo	1	1,1	1,1	2,3
Válidos De acuerdo	25	27,8	28,7	31,0
Totalmente de acuerdo	60	66,7	69,0	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 16.** Gráfico de barras de la observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 66,7 % de ellos indican que las muestra en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 27,8 % de acuerdo en que la observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en desacuerdo 1.1 % y totalmente en desacuerdo 1.1 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

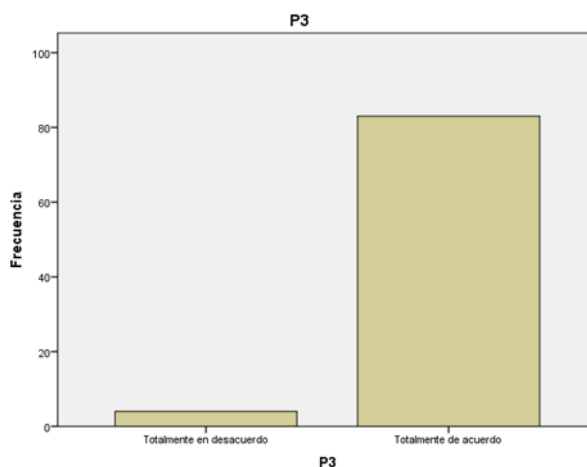
13. ¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 32.**

Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6	4,6
Válidos Totalmente de acuerdo	83	92,2	95,4	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 17.** Gráfico de barras de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 95.4 % de ellos indican que las muestra en estudio están totalmente de acuerdo en verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

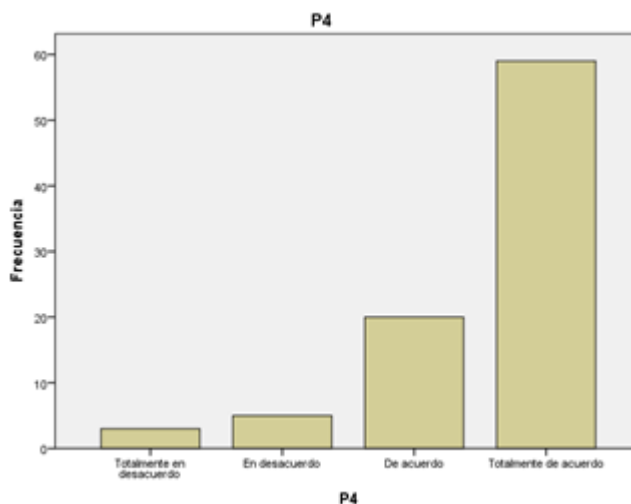
14. ¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por el agresor en este caso el volumen de semen eyaculado al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 33.**

Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por del agresor en este caso del volumen de semen eyaculado al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P4				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	3	3,3	3,4	3,4
En desacuerdo	5	5,6	5,7	9,2
Válidos De acuerdo	20	22,2	23,0	32,2
Totalmente de acuerdo	59	65,6	67,8	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 18.** Gráfico de barras de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por del agresor en este caso del volumen de semen eyaculado al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el grafico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 67,8 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 23.0 % de acuerdo en verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por el agresor en este caso el volumen de semen eyaculado al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en desacuerdo 5.7 % y totalmente en desacuerdo 3.4 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

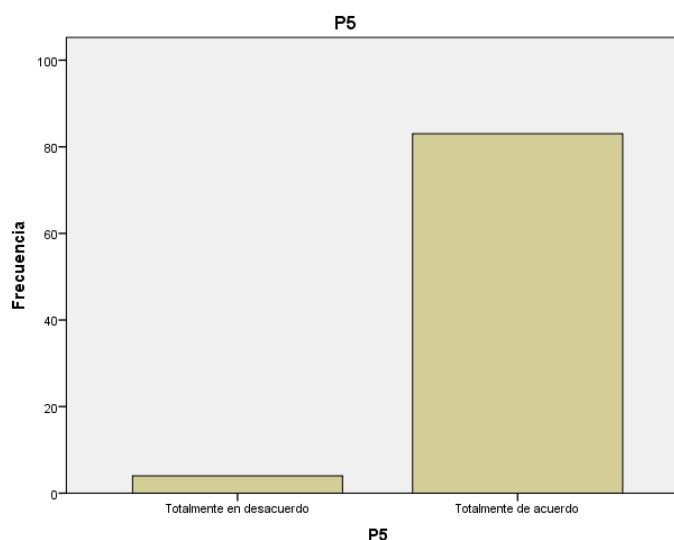
15. ¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 34.**

Análisis estadístico de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P5				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
	Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6
Válidos	Totalmente de acuerdo	83	92,2	100,0
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
	Total	90	100,0	

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 19.** Gráfico de barras de los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica; 95.4 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo en verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopia; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

**Dimensión: Procesamiento de obtención de muestras en diferentes zonas anatómicas del líquido seminal para la identificación de los espermatozoides**

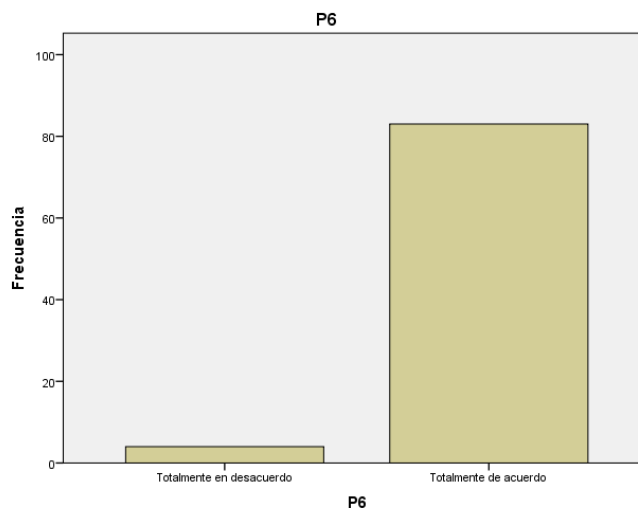
16. ¿Existe forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 35.**

Análisis estadístico de la forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P6				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
	Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6
Válidos	Totalmente de acuerdo	83	92,2	100,0
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
Total		90	100,0	

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 20.** Gráfico de barras de la forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el grafico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica; 95.4 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo en analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio

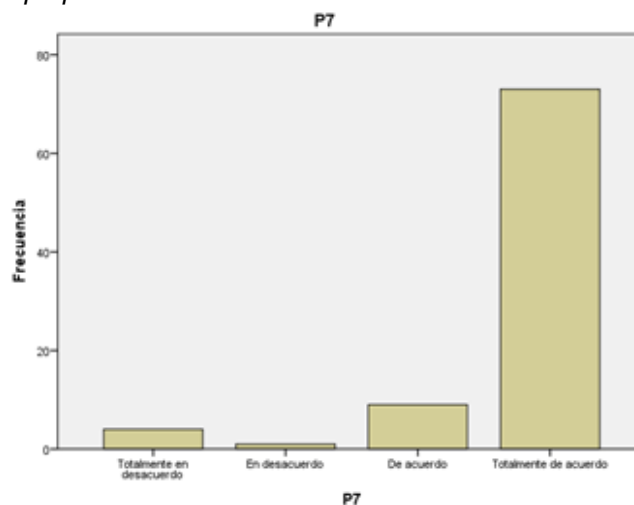
17. ¿Existe forma de estudiar la evidencia de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS mediante la técnica del doble hisopado cuya procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable?

**Tabla 36.**

Análisis estadístico de la forma de estudiar la evidencia de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS mediante la técnica del doble hisopado cuya procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable

P7				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
	Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6
	En desacuerdo	1	1,1	5,7
Válidos	De acuerdo	9	10,0	16,1
	Totalmente de acuerdo	73	81,1	100,0
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
	Total	90	100,0	

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 21.** Gráfico de barras de la forma de estudiar la evidencia de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS mediante la técnica del doble hisopado cuya procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el grafico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 83,9 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 10.1 % de acuerdo en estudiar la evidencia de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS mediante la técnica del doble hisopado cuya procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable. Asimismo, están en desacuerdo 1.1 % y totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.



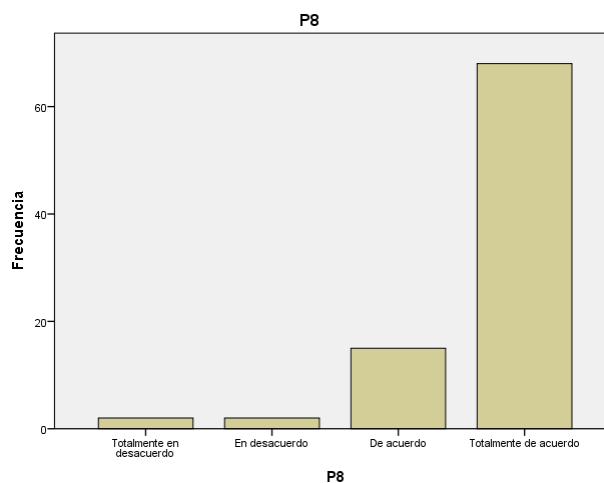
18. ¿Existe forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 37.**

Análisis estadístico de la forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P8				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	2	2,2	2,3	2,3
En desacuerdo	2	2,2	2,3	4,6
Válidos De acuerdo	15	16,7	17,2	21,8
Totalmente de acuerdo	68	75,6	78,2	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 22.** Gráfico de barras de la forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 78,2 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 17,2 % de acuerdo de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en desacuerdo 2,3 % y totalmente en desacuerdo 2,3 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

19. ¿El material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

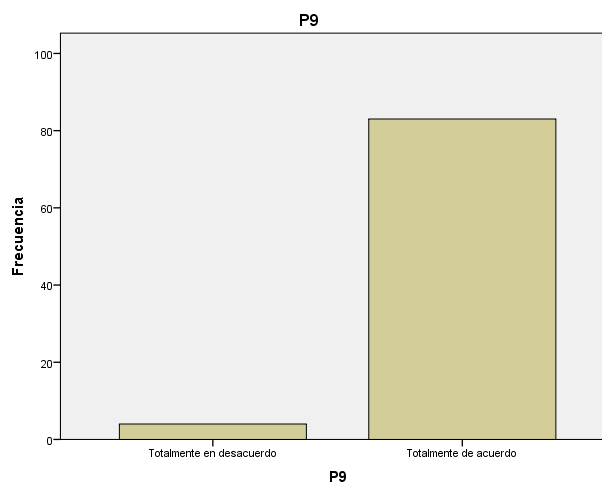
**Tabla 38.**

Análisis estadístico del material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P9

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Totalmente en desacuerdo	4	4,4	4,6	4,6
Válidos Totalmente de acuerdo	83	92,2	95,4	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 23.** Gráfico de barras estadístico del material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 95.4 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo que el material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 4.6 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio

## Dimensión: Muestra Forenses en la escena del crimen

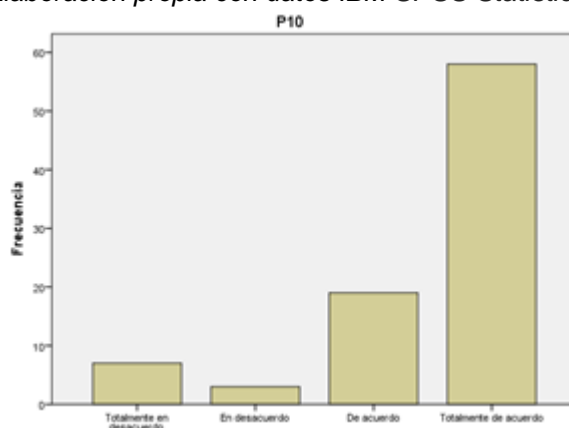
20. ¿Existe forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sábanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

### Tabla 39.

Análisis estadístico de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sábanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P10				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	7	7,8	8,0	8,0
En desacuerdo	3	3,3	3,4	11,5
Válidos De acuerdo	19	21,1	21,8	33,3
Totalmente de acuerdo	58	64,4	66,7	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 24.** Gráfico de barras de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sábanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

### Interpretación:

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 66,7 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 21,8 % de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sábanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en desacuerdo 3,4 % y totalmente en desacuerdo 8,0 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

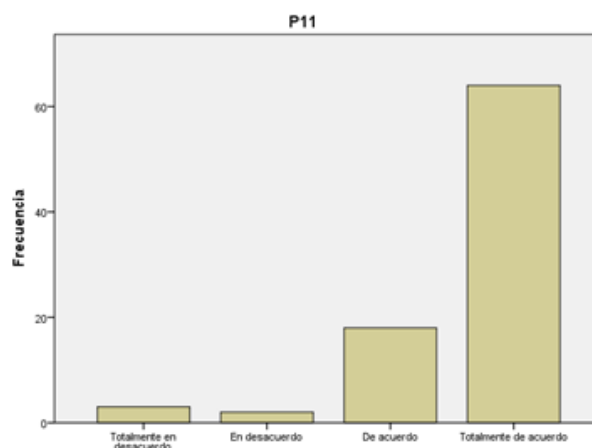
21. ¿Existe forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?

**Tabla 40.**

Análisis estadístico de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio para su estudio inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

P11				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	3	3,3	3,4	3,4
En desacuerdo	2	2,2	2,3	5,7
Válidos De acuerdo	18	20,0	20,7	26,4
Totalmente de acuerdo	64	71,1	73,6	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 25.** Gráfico de barras de la forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio para su estudio inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 73,6 % de las muestras en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 20,7 % de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio para su estudio inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación. Asimismo, están en desacuerdo 2,3 % y totalmente en desacuerdo 3,4 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

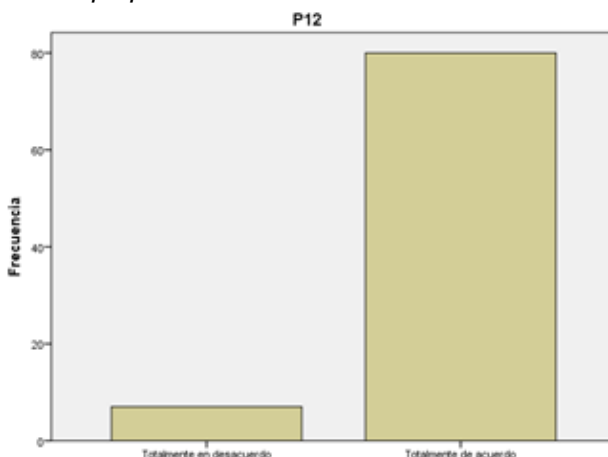
22. ¿Existe la manera de analizar por las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: como mancha; impregnado en un tejido; como fluido, mezclado con otros fluidos corporales; como la secreción vaginal, y por último; como semen o líquido espermático?

**Tabla 41.**

Análisis estadístico de la manera de analizar por las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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.

P12				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	7	7,8	8,0	8,0
Válidos Totalmente de acuerdo	80	88,9	92,0	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 26.** Gráfico de barras de la manera de analizar por las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 92.0 % de las muestra en estudio están totalmente de acuerdo de analizar por las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 8.0 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

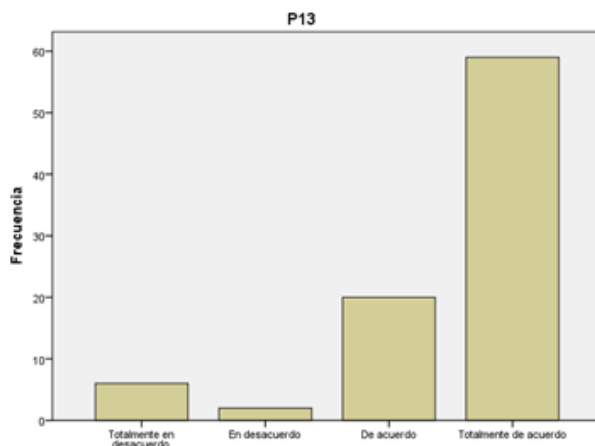
23. ¿Existe la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado?

**Tabla 42.**

Análisis estadístico de la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado.

P13				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Totalmente en desacuerdo	6	6,7	6,9	6,9
En desacuerdo	2	2,2	2,3	9,2
Válidos De acuerdo	20	22,2	23,0	32,2
Totalmente de acuerdo	59	65,6	67,8	100,0
Total	87	96,7	100,0	
Perdidos Sistema	3	3,3		
Total	90	100,0		

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 27.** Gráfico de barras de la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el 67,8 % de la muestra en estudio están totalmente de acuerdo seguidamente de un 23,0 % que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado. Asimismo, están en desacuerdo 2,3 % y totalmente en desacuerdo 6,9 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

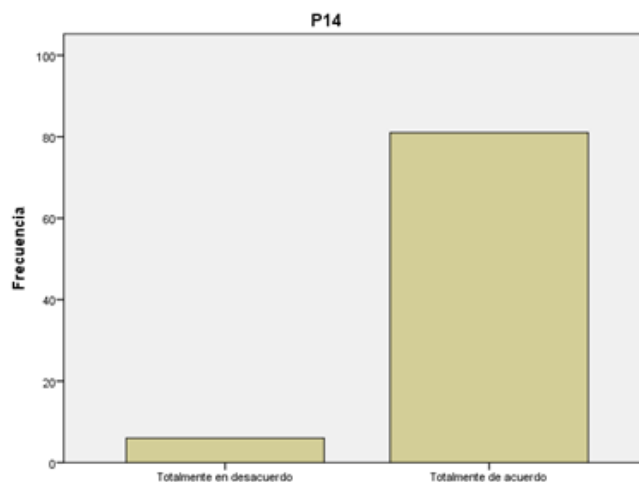
24. ¿Es importante que los procedimientos posteriores a la toma de muestra y tras realizar el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico.?

**Tabla 43.**

Análisis estadístico de lo importante que los procedimientos posteriores a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico.

P14				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Totalmente en desacuerdo	6	6,7	6,9
	Totalmente de acuerdo	81	90,0	100,0
	Total	87	96,7	100,0
Perdidos	Sistema	3	3,3	
Total		90	100,0	

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0



**Gráfico 28.** Gráfico de barras de lo importante que los procedimientos posteriores a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico.

**Interpretación:**

Analizando la tabla y el gráfico, se evidencia que de 87 evaluadores Tecnólogos Médicos especialistas en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, el; 93.1 % de la muestra en estudio están totalmente de acuerdo de la importancia que los procedimientos posterior a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico. Asimismo, están en totalmente en desacuerdo 6.9 % con la pregunta planteada en relación con la muestra de estudio.

#### 4.1.4. RESULTADOS DE LA VARIABLE 1:

##### Diseño de la aplicación informática.

a. Análisis estadístico descriptivo.

**Tabla. 44. Análisis estadístico descriptivo de la variable 1**

Estadísticos		
VARIABLE 1		
N	Válidos	87
	Perdidos	0
Media		71,34
Error típ. de la media		,376
Mediana		72,00
Moda		71 <sup>a</sup>
Desv. típ.		3,504
Varianza		9,275
Asimetría		0,277
Error típ. de asimetría		,258
Curtosis		5,309
Error típ. de curtosis		,511
Rango		15
Mínimo		60
Máximo		75
Suma		6207

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

*Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0*

#### Interpretación

De acuerdo a la tabla correspondiente a la variable 1, aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA Y citoquímica PAS, podemos evidenciar que el Coeficiente de asimetría es de 0.277. Esto significa que los datos obtenidos son homogéneos, es decir cuanto menor es la puntuación de la asimetría se acerca a la relación de la media (X) son datos homogéneos.



#### 4.1.5. RESULTADOS DE LA VARIABLE 2:

##### Diseño de la aplicación informática.

- a. Análisis estadístico descriptivo

**Tabla. 45. Análisis estadístico descriptivo de la variable 2**

Estadísticos  
VARIABLE 2

N	Válidos	87
	Perdidos	0
Media		49,14
Error típ. de la media		,118
Mediana		50,00
Moda		50
Varianza		10,213
Asimetría		0,288
Error típ. de asimetría		,258
Curtosis		,650
Error típ. de curtosis		,511
Rango		4
Mínimo		46
Máximo		50
Suma		4275

*Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0*

#### Interpretación

De acuerdo a la tabla correspondiente a la variable 2. Reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forense, podemos evidencias que el Coeficiente de asimetría es de 0.288. Esto significa que los datos obtenidos son homogéneos, es decir cuanto menor es la puntuación de la asimetría se acerca a la relación de la media (X) son datos homogéneos

## 4.2. Prueba de Hipótesis

Se ha llevado a cabo mediante la prueba de Spearman por ser variables categóricas ordinales y para ello hemos realizado el siguiente procedimiento.

### 4.2.1. Prueba de hipótesis general

#### Formulamos la hipótesis estadística

**H1:** Existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.

**H0:** No existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017

#### Tabla 46.

Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis General

Correlaciones <sup>a</sup>			
		VARIABLE 1	VARIABLE 2
Rho de Spearman	Coeficiente de correlación	1,000	,860*
	VARIABLE 1 Sig. (bilateral)	.	,001
	N	87	87
	Coeficiente de correlación	,860*	1,000
	VARIABLE 2 Sig. (bilateral)	,001	.
	N	87	87

\*. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0

#### Interpretación

En referencia: Existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017, se identificó que ambas variables presentan una alta y destacada relación ( $\rho = 0.860$   $p < 0.01$ ) con una tendencia de relación positiva, además el nivel de significancia es menor a 0,05 lo que significa que existen las evidencias suficientes para corroborar la hipótesis general.

#### 4.2.2. Prueba de hipótesis específica 1

##### Formulamos la hipótesis estadística1

**H1:** Es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017

**H0:** No es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017

##### Tabla 47.

Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis Específica 1

		Correlaciones <sup>b</sup>	
		Aplicación de la inmunotinción Antígeno Prostático Específico PSA	Estudio morfológico del espermatozoides por microscopia en muestras forenses
Rho de Spearman	Aplicación de la inmunotinción Antígeno Prostático Específico PSA	1,000	,850**
	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)		,005
	N	4	4
	Estudio morfológico del espermatozoides por microscopia en muestras forenses	,850**	1,000
	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)	,005	
	N	4	4.

**\*\*.** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0

En referencia: Es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017, se identificó que ambas variables presentan una alta y destacada relación ( $\rho = 0.850$ ,  $p < 0,01$ ) y una tendencia de la relación es positiva, además el nivel de significancia es menor a 0,05 lo que significa que existen las evidencias suficientes para corroborar la hipótesis específica 1.

### 4.2.3. Prueba de hipótesis específica 2

#### Formulamos la hipótesis estadística 2

**H1:** Es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017

**H0:** No es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.

#### Tabla 48.

Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis Especifica 2

		Correlaciones <sup>c</sup>		Aplicación de la Tinción Citoquímica Ácido peryódico de SHIFF (PAS)	Estudio morfológico del espermatozoides por microscopia en muestras forenses
Rho de Spearman	Aplicación de la Tinción Citoquímica Ácido peryódico de SHIFF (PAS)	Coefficiente de correlación	de	1,000	,960
		Sig. (bilateral)			.001
		N		2.	2
	Estudio morfológico del espermatozoides por microscopia en muestras forenses	Coefficiente de correlación	de	,960	1,000
	Sig. (bilateral)			.001	
		N		2	.2

**\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).**

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0

Se concluye: Es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017; se identificó que ambas variables presentan una fuerza de relación alta ( $\rho = 0.960$ ,  $p < 0,01$ ) y una tendencia de la relación es positiva, además el nivel de significancia es menor a 0,05 lo que significa que existen las evidencias suficientes para corroborar la hipótesis específica 2.



#### 4.2.5. Prueba de hipótesis específica 4

##### Formulamos la hipótesis estadística 4

**H1:** Es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.

**H0:** No Es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017..

##### Tabla 50.

Prueba de correlación de Rho de Spearman de la Hipótesis Especifica 4

Correlaciones <sup>e</sup>			
		Interpretación Citológica de la tinción Citoquímico PAS	Reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses
Rho de Spearman	Interpretación Citológica de la tinción Citoquímico PAS	Coeficiente de correlación	1,000
		Sig. (bilateral)	,780
		N	.
	Reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses	Coeficiente de correlación	,780*
		Sig. (bilateral)	1,000
		N	.001
		2	2

**\*\*.** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Fuente: Elaboración propia con datos IBM SPSS Statistics 24.0

Se concluye: Es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017 ; se identificó que ambas variables presentan una fuerza de relación alta ( $\rho = 0.780$ ,  $p < 0,01$ ) y una tendencia de la relación es positiva, además el nivel de significancia es menor a 0,05 lo que significa que existen las evidencias suficientes para corroborar la hipótesis específica 4.

**Tabla. 51.**

Resumen: Prueba de correlación de Rho de Spearman

	<b>HIPOTESIS</b>	<b>COEFICIENTE DE CORRELACION</b>	<b>NIVEL</b>
<b>General</b>	Existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.	<b>0.860</b>	<b>Alta</b>
<b>Específica</b>	Es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.	<b>0.960</b>	<b>Alta</b>
	Es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.	<b>0.850</b>	<b>Alta</b>
	Es notoria la alta relación entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.	<b>0.870</b>	<b>Alta</b>
	Es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.	<b>0.780</b>	<b>Alta</b>

Fuente: Elaborado por el investigador de tesis con datos IBM SPSS Statistics 24.0

### 4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

De acuerdo con los resultados alcanzados en este estudio, la evaluación de la fiabilidad y la escala que evaluó la aplicación de la inmunocitoquímica PSA (Antígeno Prostático Específico) y citoquímica PAS (Ácido Periódico de Schiff), se obtuvo un alpha de Cronbach de 0.950 según la tabla categórica se determina que el instrumento de medición es de consistencia interna con tendencia a ser muy alta, para la evaluación de la fiabilidad del reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses en víctimas por violencia sexual, los resultados del alpha de Cronbach de 0.948 según la tabla categórica se determina que el instrumento de medición es de consistencia interna con tendencia a ser muy alta.

Del mismo modo a partir de los hallazgos encontrados, aceptamos la hipótesis alternativa general que establece que existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.

Estos resultados guardan relación con la que sostiene Según López K. (2013). Indicando que el reconocimiento e identificación de manchas de semen en diferentes soportes de interés forense, es primordial en la búsqueda de espermatozoides, comprobando la gran importancia de su evaluación en criminalística ya que constituye una prueba precisa y útil en una correcta investigación pericial mediante una serie de normas o protocolos estandarizados; donde la investigación está asociado directamente a Crímenes de Índole Sexual. Ello es acorde con lo que este estudio se halla.

Pero en lo que no concuerdo con la autora referida en su trabajo en la que menciona que el reconocimiento de las manchas de semen en los



diferentes soportes con ambas técnicas de tinción (coloración Gram y Cristal Violeta), pueden ser utilizadas en la Prueba de certeza (microscopía) teniendo en cuenta que la tinción Gram permite una mejor visualización y diferenciación de otros tipos de células y/o bacterias.

Con respecto a la hipótesis, sobre si es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual, nuestro trabajo de tesis encuentra relación con Cisneros y Villarroel (2016) en la cual sostiene que sus estudios aplicando ensayos inmunocromatográficos para la detección de proteína P-30 del cual presenta como uso comercial las pruebas como PSA-check-1; Seratec® PSA Semiquant y One Step ABACard PSA. Su estudio se dirige al kit ABACard PSA debido a que es el más empleado es en área forense, ya que este reactivo utiliza anticuerpos monoclonales antiP-30 humanos que se unen al antígeno prostático específico (P-30) formando un complejo antígeno-anticuerpo. Se demuestra que el límite inferior de detección es de 4 ng/l, por lo que una muestra que contenga una cantidad igual o superior, es evidenciada por la prueba, determinando un resultado positivo. Del cual concuerdo con el estudio de investigación realizado.

Sin embargo nuestro estudio no concuerda con Cuiza, C. (2012), autora de la investigación titulada; Labor de la sección de biología forense en la investigación de delitos sexuales, donde denomina a la tinción "árbol de navidad", como específica debido a los resultados de nuestra investigación en la que encontramos que es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual. Se identificó que ambas variables presentan una fuerza de relación alta ( $\rho = 0.960$ ,  $p < 0,01$ ), con tendencia de relación positiva.

En lo que respecta a los estudios de Cortez, B. y Logroño, K. (2015) donde evaluaron los casos forenses provenientes del Centro de Investigación de Ciencias Forenses de la ciudad de Ambato por Medicina Forense y el Laboratorio en el Ecuador. Nuestro trabajo concuerda con el estudio de investigación realizado ya que los investigadores al aplicar 2 métodos de alta sensibilidad y especificidad para la búsqueda de semen: Proteína (P30), y Antígeno Prostático Específico (PSA), el mismo que es un marcador específico del varón, concluyen que el estudio de manchas de líquido seminal constituye una prueba precisa y útil en la resolución de casos asociados a estos delitos. Las dos técnicas empleadas en el laboratorio forense son de gran validez, conclusión que es relacionando con lo hallado en nuestro trabajo ya que es notoria la alta relación entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual, donde se identificó que ambas variables presentan una fuerza de relación alta ( $\rho = 0.870$ ,  $p < 0,01$ ) y una tendencia de relación positiva.

Los estudios de Cisneros y Villarroel (2016) indican que la visualización microscópica de espermatozoides sigue siendo considerada la prueba definitiva para la demostración de espermatozoides en los laboratorios de biología forense, y que las técnica histoquímica como se utiliza de forma corriente como tinción identificativa de células espermáticas, debido a que los métodos se caracterizan por discernir principalmente espermatozoides completos o cabezas de espermatozoide de células no espermáticas, bien células epiteliales o levaduras, que regularmente están presentes en las muestras procedentes de una agresión sexual. Así mismo Cuiza, C. (2012) concluye que los procedimientos investigación se ven influenciados directamente por el tiempo, siendo importante esta variable en la valoración de la víctima y la toma de muestras para su procedimiento en laboratorio en delitos sexuales. Estos resultados guardan afinidad con nuestro resultados ya que es

evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual, en la cual se identificó que ambas variables presentan una fuerza de relación alta ( $\rho = 0.870$ ,  $p < 0,01$ ) y una tendencia de la relación positiva, con un nivel de significancia menor a 0,05 lo que significa que existen las evidencias suficientes para corroborar nuestra tesis.

Finalmente, Bouvet, Pavesi, Paparella, & Ombrella, 2017; en su estudio titulado, Identificación de espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras, indica que el hallazgo de un espermatozoide es un estándar de oro en la ciencia forense, pero este caso no es de alta frecuencia, debido a la labilidad del espermatozoide frente a cambios osmóticos y a la deshidratación, que trae como consecuencia la observación de sólo cabezas de los mismos. El espermatozoide es una célula con características morfológicas especiales, y aplicando diferentes coloraciones se observa intensamente teñido el núcleo y en forma tenue el acrosoma. Con cuerda además con el trabajo de investigación de Cuiza, C. (2012), indicando que por la naturaleza de la muestra con que se cuenta y el tratamiento que se le da en la preparación de las muestras, es posible observar morfologías atípicas tales como la ausencia de cola, razón por la cual es necesario que los peritos sean debidamente formados y con experiencia para realizar este tipo de análisis.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

1. Existen evidencias en los resultados de una significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017., tal como se demuestra en la fuerza de relación, igual a ( $r = 0.860$ ,  $p < 0.01$ ), en base a los resultados existe un manejo alto de los estudio morfológico del espermatozoide por microscopía, procesamiento de obtención de muestras en diferentes zonas anatómicas del líquido seminal para la Identificación de los espermatozoides, muestra Forenses en la escena del crimen, marcador

Inmunocitoquímico (Antígeno Prostático Específico) PSA, técnica Citoquímica (Ácido peryódico de SHIFF) PAS, reconocimiento y valoración Microscópica del Espermatozoide con el método de Inmunocitoquímica PSA y el reconocimiento y valoración Microscópica del Espermatozoide con el método de Citoquímica PAS.

2. Existen evidencias de la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017., tal como se demuestra en la fuerza de relación, igual a ( $r = 0.960$ ,  $p < 0.01$ ), esta tendencia contrasta el nivel alto en evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual, evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual, la diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual, aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente.
3. Existen evidencias de la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017., tal como se demuestra en la fuerza de relación, igual a ( $r = 0.850$ ,  $p < 0.01$ ), esta tendencia contrasta el nivel alto en evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando

el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual y evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

4. Existen notoriedad de una alta relación entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017., tal como se demuestra en la fuerza de relación, igual a ( $r = 0.870$ ,  $p < 0.01$ ), esta tendencia contrasta el nivel alto de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual, la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.
  
5. Existen evidencias de la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017., tal como se demuestra en la fuerza de relación, igual a ( $r = 0.780$ ,  $p < 0.01$ ), esta tendencia contrasta el nivel alto de la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la citoquímica PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual y la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

1. Con respecto a que existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017. Se recomienda incorporar y difundir el presente estudio las autoridades competentes que solicitan los análisis en víctimas por violencia sexual (fiscales y jueces), así como a médicos forenses y demás personas que forman parte del sistema de justicia peruano, con el fin brindar una herramienta útil, respecto a las bases científicas de los análisis Inmunocitoquímico y Citoquímico forenses en casos de violación sexual.
2. Con respecto a que es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017. Se sugiere la aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, y que puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente.
3. Con respecto a que es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Schiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017. Se sugiere que para la aplicación del método citoquímica PAS para evidenciar microscópicamente los espermatozoides en muestras forenses, esta sea tomada como mínimo en tres hisopos por región anatómica a estudiar obtenidas en víctimas de agresión sexual para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

4. Con respecto a que es notoria la alta relación entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017. Se sugiere que sea realizado por el especialista en histotecnología ó Citotecnólogo como perito con respecto a los análisis inmunohistoquímico a investigar.
  
5. Finalmente, con respecto a que es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017. Se sugiere que sea realizado por el especialista en histotecnología ó Citotecnólogo como perito en los análisis Citoquímico a investigar.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cisneros, J., & Villarroel, C. (2016). *Determinación de proteína p-30 y rastreo de espermatozoides en personas víctimas de agresión sexual en el centro de investigación de ciencias forenses-Tungurahua en el período enero-agosto 2015*. Riobamba, Ecuador: Universidad nacional de Chimborazo. Facultad de ciencias de salud. Riobamba-Ecuador.

Cortez, B., & Logroño, K. (2016). ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA DETERMINACIÓN DE PSA TOTAL Y P30 PARA LA VALORACIÓN DE LÍQUIDO SEMINAL EN CASOS FORENSES DURANTE EL PERIODO OCTUBRE 2015 – MARZO 2016 EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE CIENCIAS FORENSES DE LA CIUDAD DE AMBATO. RIOBAMBA, ECUADOR: UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD.

Instituto de medicina legal del Perú. (2012). Guía médico legal. Evaluación física de la integridad sexual. 2. Lima, Perú: Ministerio público fiscalía de la nación. Jefatura nacional del instituto de medicina legal.

López, D., Pérez Cuautle, M., Magallón, A., Pérez Lezama, E., Castro, M., de la Rosa, K., . . . Pérez, M. (Enero- Marzo de 2014). Delito sexual 'violación. SECCIÓN CRIMINOLÓGICA-CRIMINALÍSTICA. *VISIÓN CRIMINOLÓGICA-CRIMINALÍSTICA*, 2(5), 8-17.

Martínez, J., Conejero, N., Garrido, C., Simón, A., Pellicer, J., Remohí, M., & Meseguer, M. (Junio de 2004). MUC-1 E IL6: POSIBLES MARCADORES DE

FERTILIDAD EN REPRODUCCIÓN HUMANA. REVISIÓN. *Asociación para el estudio de la biología de la reproducción*, 9(1), 12-22.

Terán, M. (2011). *Propuesta de la aplicación de un manual de procedimientos para la colección de indicios biológicos en el lugar del hecho y en el cadáver, para los funcionarios policiales de la división de laboratorio técnico científico de la FELCC zona central la paz*. La Paz, Bolivia: Universidad Mator de SAN ANDRÉS Facultad de Medicina.

Acevedo, B. (2012). GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL Universidad de Ciencias Médicas de la Habana Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB. 15-17. Habana, Cuba.

Acuerdo plenario N° 4-2015/CIJ-116. (Julio de 2016). VALORACIÓN DE LA PRUEBA PERICIAL EN DELITOS DE VIOLACIÓN SEXUAL. IX PLENO JURISDICCIONAL DE LAS SALAS PENALES PERMANENTE Y TRANSITORIA - 2015, Primera, 75-94. Lima, Perú: Poder Judicial. Fondo Editorial.

Barrera , J. (2015). *El principio de transferencia en la escena del crimen y en el cuerpo de la víctima*. Quito, Ecuador: Centro Universitario Villa Flora.

Bouvet, B., Pavesi, A., Paparella, C., & Ombrella, A. (Julio de 2017). Identificación de espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras. *CienciaUAT*, 12(1), 23-35.

Cerdas , L., López, T., & Espinoza, M. (2005). *El papel de la sección de bioquímica en la investigación por agresión sexual en COSTA RICA*. Obtenido de Poder Judicial:

[https://www.google.com.pe/search?biw=1366&bih=637&ei=GP5jWqv\\_BILesAXS4qWwCA&q=Cerdas%2C+L.%2C+L%C3%B3pez%2C+T.%2C+y+Espinoza%2C+MEI+papel+de+la+secci%C3%B3n+de+bioqu%C3%ADmica+en+la+investigaci%C3%B3n+por+agresi%C3%B3n+sexual+en+Costa+Rica&oq=Cerdas%2C+L.](https://www.google.com.pe/search?biw=1366&bih=637&ei=GP5jWqv_BILesAXS4qWwCA&q=Cerdas%2C+L.%2C+L%C3%B3pez%2C+T.%2C+y+Espinoza%2C+MEI+papel+de+la+secci%C3%B3n+de+bioqu%C3%ADmica+en+la+investigaci%C3%B3n+por+agresi%C3%B3n+sexual+en+Costa+Rica&oq=Cerdas%2C+L.)

Chaves, D. (FEBRERO de 2014). LA INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA PERICIAL BIOQUÍMICO FORENSE REALIZADA EN FLUIDOS CORPORALES HUMANOS: ANÁLISIS JURÍDICO - CIENTÍFICO EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS DELITOS SEXUALES. *Título III. La prueba pericial bioquímica forense en fluidos biológicos, su análisis científico e interpretación jurídica durante la investigación de delitos*, 171-244. Costa Rica: Universidad de Costa Rica Facultad de Derecho.

Cisneros, J., & Villarroel, C. (2016). "DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA P-30 Y RASTREO DE ESPERMATOZOIDES EN PERSONAS VÍCTIMAS DE AGRESIÓN SEXUAL EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE CIENCIAS FORENSES-TUNGURAHUA EN EL PERÍODO ENERO-AGOSTO 2015.". 14-15. Riobamba, Ecuador: UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS DE SALUD CARRERA LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO.

Cuiza Campana, C. (Julio de 2012). labor de la seccion de biologia forense en la investigacion de EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FORENSES IDIF. *Archivos Bolivianos de Medicina*, 16(84), 13,16.

- Dabbs, D. (2006). *Inmunohistoquímica Diagnóstica: teranóstica y genómica* (3° ed.). Philadelphia, Estados Unidos: Saunders Elsevier.
- de, I. N., & Instituto Nacional de Medicina Legal, y. c. (Agosto de 2011). GUÍA DE PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACIÓN MÉDICO.
- Defensoría del Pueblo. (NOVIEMBRE de 2011). Violencia sexual en el Perú: Un estudio de casos judiciales. Lima, Perú.
- Estévez, J. (Junio de 2011). Formación criminalística enfoque pericial algunos aspecto de la investigación científica forense. Guatemala: Universidad Mariano Gálvez de Guatemala Facultad de ciencias jurídicas y sociales Escuela de ciencias criminológicas y criminalísticas.
- Fiscalía General del Estado. Ecuador. (10 de Agosto de 2014). *Manual de procedimientos de laboratorio de biología forense*. Obtenido de Sistema especializado integral de investigación en medicina legal y ciencias forenses.: [www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/.../Resolucin\\_N\\_073-FGE-2014.pdf](http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/.../Resolucin_N_073-FGE-2014.pdf)
- García, M. (Junio de 2012). Asociación de resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual. 4-16. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- García, R. (1987). *Histoquímica de hidratos de Carbono o glúcidos. Laboratorio de Anatomía Patológica*. Madrid, España: nteramericana McGraw Hill,.
- Giannuzzi, L., Ferrari, L., & Nieto, R. (2006). *Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química forense - Mancha de semen*. Buenos aires, Morón, Argentina: Praia.

- Giannuzzi, L., Ferrari, L., & Nieto, R. (2006). *Manual de Técnicas Analíticas en el Laboratorio de Toxicología y Química Forense*; . Buenos Aires, Morón, Argentina: Praia.
- Gimeno, I. (2016). *Morfología espermática y parámetros*. València, España: Universidad politécnica de València.
- Grandini, J. (2009). *Medicina Forense. Aplicaciones Teóricas prácticas (2 ed.)*. Mexico : Manual Moderno.
- Grandini, J. (2009). *Medicna Forense. Aplicaciones teóricas prácticas (2 ed.)*. Mexico, México: Manual moderno.
- Instituto de medicina legal y ciencia forense . (31 de Agosto de 2011). Guía de procedimientos para la evaluación médico forense de los delitos sexuales. Panamá: Sub dirección de medicina forense. Sección clínica meédico legal. Unidad de consulta externa.
- Instituto de medicina legal y ciencia forense, P. (31 de Agosto de 2011). Guía de procedimientos para la evaluación médico forense de los delitos sexuales. Panamá: Sub dirección de medicina forense. Sección clínica meédico legal. Unidad de consulta externa.
- Kirk, p. (1953). *Crime Investigation (2 ed.)*. (t. Jhon, Ed.) New York, estados unidos: jhon wiley & sons.
- Li, T., & Beling, C. (Febrero de 1973). 24(2). Obtenido de El efecto de los anticuerpos frente a dos antígenos específicos del plasma seminal humano. Fertilidad y Esterilidad: [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(16\)39496-1/abstract](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(16)39496-1/abstract)

- Li, T., & Belling, C. (1974). THE EFFECT OF ANTIBODIES TO TWO HUMAN SEMINAL. Department of Obstetrics and Gynecology, Cornell University Medical College, New York,. *Obstetrics and Gynecology*, 25(10).
- López, D., Pérez, M., Pérez, J., Magallón, A., Pérez, E., Vallina, M., & de la Rosa, K. (ENERO-MARZO de 2014). Delito sexual 'estupro'. (Grupo Universitario de Puebla A. C., Ed.) *VISIÓN CRIMINOLÓGICA-CRIMINALÍSTICA*, 2(5), 18-22.
- López, K. (Oct de 2013). Reconocimiento e identificación de manchas de semen en diferentes soportes de interés forense. 1. Lima, Perú: Universidad nacional Federico Villareal. facultad de ciencias naturales y matemática. Escuela académico profesional de biología.
- Lynch, M., Raphael, S., Mellor, L., Spare, P., & Inwood, M. (1987). *Métodos de Laboratorio* (2 ed., Vol. 2). Mexico: Interamericana.
- Martín, I., & García, T. (2012). *Atlas de Inmunohistoquímica Caracterización de células, tejidos y organos normales* (1 ed.). Coruña, España: Diaz de Santos.
- Miranda, M. (Abril de 2009). Johannes Vermeer y Anthon van Leeuwenhoek: El arte y la ciencia de Delft unidos en su máxima expresión en el siglo de oro holandés. *Rev Méd Chile*, 137(4), 567-574.
- Montero, C. (1997). *Manual de Técnicas de Histoquímicas básicas. Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina de la Universidad Autonoma San Luis de Potosí*. San Luis de Potosí, Mexico: Universitaria de Potosiana.
- Mujica, J. (2011). Violaciones sexuales en el Perú 2000-2009. *Centro de Promoción y Defensa de los Derechos Sexuales y Reproductivos (PROMSEX)*, 1. Lima, Perú.

- Organización Mundial de la Salud. (Abril de 2001). Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical . Madrid, España: Medica Panamericana, S.A.
- Pacheco , J., Pacora, P., De la Cruz , N., & Diaz, N. (Octubre-Diciembre de 2012). Violencia y abuso sexual contra la mujer: Evaluación médico legal y clínico terapéutica de la mujer agredida física y/o sexualmente. *Diagnóstico. Fundación Instituto Hipólito Unanue*, 51(4), 189-197.
- Parry, , N. (15 de Enero de 2018). *Why Pick PAS for Histology*. Obtenido de <http://bitesizebio.com/13413/why-pick-pas-for-histology/>
- Parvin Ganjei, A., & Mehrdad, N. (2007). *Atlas de color de inmunocitoquímica*. New York,: 2007 Springer Science+Business Media, LLC.
- Pavesi, A., Ombrella, A., Cadierno, A., Kuberling, L., Mansilla, R., Paparella, C., . . . Bouvet, B. (15 de Enero de 2015). *IDENTIFICACION DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES*. (I. M. Rosario., Ed.) Obtenido de Área Química Analítica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia. Microbiología Facultad de Ciencias Médicas. (UNR): [www.unr.edu.ar/descargar.php?id=20168](http://www.unr.edu.ar/descargar.php?id=20168)
- Pearse, A. (1951). • A review of modern methods in histochemistry. *Journal of Clinical Pathology* , 4, 1-36.
- Pujar, A., Pereira, T., Tamgadge, A., Bhalerao, S., & Tamgadge, S. (octubre de 2015). Comparación de la eficacia de la hematoxilina y la eosina, el ácido periódico de Schiff y el ácido fluorhídrico periódico Schiff-Acriflavine Técnicas para la

demostración de la membrana basal en el líquen plano oral: un estudio Histoquímico. *Indian Journal of Dermatology*, 60(5), 450-456.

Quintana, O. (2015). *Importancia del uso y manejo de luces forenses en la escena del delito por parte de los peritos de inspección ocular técnica del departamento de criminalística de pichincha para la determinación orientativa de la presencia de indicios biológicos*. Quito, Ecuador: INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR “POLICÍA NACIONAL”.

Quispe, S., Tarifa, S., Soliz, R., & Sierra, A. (Diciembre de 2010). Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense. *BIOFARBO*, 18(2), 91-95.

Rozo, M. (2014). *LA MUJER COMO SUJETO ESPECIAL DE PROTECCIÓN EN LAS POLÍTICAS PÚBLICAS DE DESPLAZAMIENTO FORZADO: UNA MUESTRA DE LA REALIDAD*. Bogotá, Colombia: UNIVERSIDAD CATÓLICA DE COLOMBIA.

Sawaya, M., & Rolim, M. (2004). Antígeno específico da próstata en fluidos biológicos: aplicación forense. *Instituto Médico Legal de Curitiba-Paraná*, 5(2), 109-115. Brasil: Visão Acadêmica.

Schmitt , I. (23 de OCTUBRE de 2017). *Se reportaron 6,118 casos de violencia sexual entre enero y septiembre*. Obtenido de <http://rpp.pe/peru/actualidad/se-reportaron-6118-casos-de-violencia-sexual-entre-enero-y-septiembre-noticia-1084202>



- Sensabaugh, G. (1978). Aislamiento y caracterización de un semen específico  
Proteína del plasma seminal humano: un nuevo marcador potencial para la  
identificación del semen. *Journal of Forensic Sciences*, 23(1), 106-115.
- Serviánsky, T., Kresch, N., Moreno, G., Arenas, R., & Vega, E. (Enero-Marzo de  
2013). Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico.  
*Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. Departamento de  
Dermatología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", SS*, 11(1), 13-18.
- Tomasi, V. (25 de Noviembre de 2008). *Fijación de muestras biológicas*. Obtenido de  
Fijación de Muestras Biológicas:  
<http://educacionhistotecnologiafijaciondos.blogspot.pe/>.
- Triana, I. C. (2015). *Caracterización morfométrica de espermatozoides en pacientes  
con espermograma normal* (19 ed., Vol. 4). Santa Clara, Cuba: Revista  
Científica Villa Clara.
- Triana, I., López, R., García, M., Santana, A., Fleites, M., & Sánchez, P. (Oct. Dic. de  
2015). Caracterización morfométrica de espermatozoides en pacientes con  
espermograma normal (resultados preliminares). *Villa Clara*, 19(4), 225-232.
- Uribe, J. (2008). La bioquímica del antígeno específico de. *Medicina & Laboratorio*,  
14(3-4), 153-163.
- Wojciech, P. (2015). *Histología Texto y Atlas Correlación con biología celular y  
molecular* (7 ed.). Wolters Kluwer.

## ANEXO 1

### CARTA DE PRESENTACIÓN

Señor(a) (ita):

Dra. Angelo Ascarza Gallegos

Asunto: **VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO A TRAVÉS DE JUICIO DE EXPERTOS.**

Nos es muy grato comunicarnos con usted para expresarle nuestros saludos y así mismo, hacer de su conocimiento que como estudiante de la Escuela de Posgrado de la Universidad Privada Norbert Wiener, de la especialidad de Ciencias Criminalísticas, le solicito su valiosa colaboración en la validación del instrumento para recabar la información requerida para llevar a cabo el desarrollo de mi tema de investigación y con el cuál optaré el grado de Maestro en Ciencias Criminalísticas.

El título correspondiente a mi tema de investigación es “**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.**” y siendo indispensable contar con la aprobación de expertos para poder aplicar los instrumentos en mención, hemos considerado conveniente dirigirme a usted, ante su connotada experiencia profesional en temas de pericias en violencia sexual, donde sus observaciones y recomendaciones contribuirán para mejorar la versión final de mi trabajo.

El expediente de validación, que le hacemos llegar contiene:

Anexo N° 1: Carta de presentación

Anexo N° 2: Matriz de operacionalización de variables

Anexo N° 3: Matriz del instrumento para la recolección de datos

Anexo N° 4: Certificado de validez de contenido del instrumento.

Expresándole nuestros sentimientos de respeto y consideración nos despedimos de usted, no sin antes agradecerle por su atención y contribución al mejoramiento de la investigación científica.

Atentamente:

**LIC. CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ**  
**DNI: 09435522**

## ANEXO 1

### CARTA DE PRESENTACIÓN

Señor(a) (ita):

Lic. Fernando Palacios Butrón

Asunto: **VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO A TRAVÉS DE JUICIO DE EXPERTOS.**

Nos es muy grato comunicarnos con usted para expresarle nuestros saludos y así mismo, hacer de su conocimiento que como estudiante de la Escuela de Posgrado de la Universidad Privada Norbert Wiener, de la especialidad de Ciencias Criminalísticas, le solicito su valiosa colaboración en la validación del instrumento para recabar la información requerida para llevar a cabo el desarrollo de mi tema de investigación y con el cuál optaré el grado de Maestro en Ciencias Criminalísticas.

El título correspondiente a mi tema de investigación es “**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.**” y siendo indispensable contar con la aprobación de expertos para poder aplicar los instrumentos en mención, hemos considerado conveniente dirigirme a usted, ante su connotada experiencia profesional en temas de pericias en violencia sexual, donde sus observaciones y recomendaciones contribuirán para mejorar la versión final de mi trabajo.

El expediente de validación, que le hacemos llegar contiene:

Anexo N° 1: Carta de presentación

Anexo N° 2: Matriz de operacionalización de variables

Anexo N° 3: Matriz del instrumento para la recolección de datos

Anexo N° 4: Certificado de validez de contenido del instrumento.

Expresándole nuestros sentimientos de respeto y consideración nos despedimos de usted, no sin antes agradecerle por su atención y contribución al mejoramiento de la investigación científica.

Atentamente:

**LIC. CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ**  
**DNI: 09435522**

## ANEXO 1

### CARTA DE PRESENTACIÓN

Señor(a) (ita):

Lic. Cesar Quispe Asto

Asunto: **VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO A TRAVÉS DE JUICIO DE EXPERTOS.**

Nos es muy grato comunicarnos con usted para expresarle nuestros saludos y así mismo, hacer de su conocimiento que como estudiante de la Escuela de Posgrado de la Universidad Privada Norbert Wiener, de la especialidad de Ciencias Criminalísticas, le solicito su valiosa colaboración en la validación del instrumento para recabar la información requerida para llevar a cabo el desarrollo de mi tema de investigación y con el cuál optaré el grado de Maestro en Ciencias Criminalísticas.

El título correspondiente a mi tema de investigación es “**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.**” y siendo indispensable contar con la aprobación de expertos para poder aplicar los instrumentos en mención, hemos considerado conveniente dirigirme a usted, ante su connotada experiencia profesional en temas de pericias en violencia sexual, donde sus observaciones y recomendaciones contribuirán para mejorar la versión final de mi trabajo.

El expediente de validación, que le hacemos llegar contiene:

Anexo N° 1: Carta de presentación

Anexo N° 2: Matriz de operacionalización de variables

Anexo N° 3: Matriz del instrumento para la recolección de datos

Anexo N° 4: Certificado de validez de contenido del instrumento.

Expresándole nuestros sentimientos de respeto y consideración nos despedimos de usted, no sin antes agradecerle por su atención y contribución al mejoramiento de la investigación científica.

Atentamente:

**LIC. CARLOS HUGO GARCÍA VÁSQUEZ**  
**DNI: 09435522**

ANEXO 2

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	INDICES (Reactivos)	ESCALA DE MEDICIÓN
<p>VARIABLE 1 APLICANDO LA INMUNOCITOQUIMICA PSA Y CITOQUIMICA PAS</p>	<p>García R. (2012). Inmunocitoquímica ó inmunohistoquímica llamada también inmunotinción es un procedimiento Cito-histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar y al que se denomina antígeno. Además, nos dice que estos anticuerpos están unidos a una enzima o esta puede encontrarse unida a un anticuerpo secundario que reconoce y se une al anticuerpo primario. Aplicado a un tejido orgánico o un extendido celular, el anticuerpo primario se une específicamente al sustrato (Tejido viable antigénicamente "fijado en formol o producto citológico fijado en alcohol como también tejido congelado.) y se aprovecha la actividad enzimática para visualizar la unión. El producto originado al actuar la enzima sobre el sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado, al igual que ocurre en todas las reacciones inmunológicas. Las técnicas Citoquímica e Histoquímicas guardan una estrecha relación y se ocupan de</p>	<p>Martin, I y col (2012). PSA en inmunohistoquímica es un marcador tumoral específicamente expresado por el epitelio prostático. El PSA está presente en el citoplasma del epitelio benigno y maligno de la próstata. El espermatozoide como célula especializada, flagelada está constituido en sus tres regiones por el antígeno prostático específico PSA y este a su vez facilita que sea observable microscópicamente por la unión antígeno anticuerpo con alta sensibilidad y especificidad del método permitiendo que la inmunocitoquímica sea una prueba confirmatoria en delitos sexuales. VIGIL, P. (2015) La tinción ácido periódico de Schiff (PAS) es una de las técnicas de tinción especial más comúnmente realizada en el laboratorio de histopatología que</p>	<p>Antígeno Prostático Especifico</p> <p>Acido peryódico de SHIFF</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> <li>• Frotis o extensiones</li> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> <li>• Método empleado (Peroxidasa anti-peroxidasa)</li> <li>• Recuperación del antígeno</li> <li>• Avidéz por el antígeno</li> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Alta especificidad</li> <li>• Reproducibilidad</li> <li>• Relación entre la concentración del anticuerpo e intensidad de la reacción</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> <li>• Frotis o extensiones</li> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> <li>• Método químico colorimétrico</li> <li>• Oxidación de los carbohidratos</li> <li>• Formación de los grupos aldehidos</li> <li>• Reacción de mucopolisacaridos</li> <li>• Intensidad de la reacción</li> <li>• Especificad de la reacción</li> </ul>	<p>Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>

<p style="text-align: center;">VARIABLE 1</p> <p style="text-align: center;">APLICANDO LA INMUNOCITOQUIMICA PSA Y CITOQUIMICA PAS</p>	<p>investigar la actividad química que tiene lugar en las células y los tejidos. Sin embargo estas técnicas son metodologías de <u>trabajo</u> aplicadas por los Citotecnólogos e Histotecnólogos, y consiste en realizar diferentes tinciones a una porción de tejido o células que se somete a investigación, las tinciones se emplean para <u>poder</u> apreciar las diferentes estructuras que conforman al tejido estudiado y dependiendo de la <u>estructura</u> que se desea investigar es la tinción que se va aplicar.</p>	<p>se utiliza para poner de relieve las moléculas con alto porcentaje de contenido de carbohidratos tales como mucina, glucógeno, microorganismos micóticas, parasitarios y para delimitar la membrana basal en la piel y en otros tejidos especialmente las que contiene mucopolisacáridos Neutros. En nuestro caso, nos sirve de gran utilidad para la visualización de las mucinas MUC1 y MUC8 presentes en la membrana de los espermatozoides químicamente demostrado con el método de PAS.</p>	<p style="text-align: center;">Valoración de la inmunotinción</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad de la reacción</li> <li>• Reproducibilidad</li>   <li>• Característica microscópica del inmunotinción</li> <li>• Presencia de inmunotinción</li> <li>• Ausencia de inmunotinción</li> <li>• Localización celular de la inmunotinción</li> <li>• Localización extracelular de la inmunotinción</li> <li>• Patrón extracelular</li> <li>• Patrón citoplasmático</li> <li>• Interpretación de resultados</li> <li>• Débil en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>• Moderado en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>• Fuerte en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>• Reactividad focal &lt;20% +</li> <li>• Reactividad variable 20 – 80% ++</li> <li>• Reactividad uniforme &gt; 80% +++</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Politémica (Likert o alternativas múltiples)</p>
---	---	---	---	--	---

<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 1</b></p> <p style="text-align: center;"><b>APLICANDO LA INMUNOCITOQUIMICA PSA Y CITOQUIMICA PAS</b></p>			<p style="text-align: center;"><b>Valoración de la tinción histoquímica</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Característica microscópica de la reacción histoquímica</li> <li>• Presencia de la reacción histoquímica</li> <li>• Ausencia de la reacción histoquímica</li> <li>• Localización celular de la reacción histoquímica</li> <li>• Localización extracelular de la reacción histoquímica</li> <li>• Patrón extracelular</li> <li>• Patrón citoplasmático</li> <li>• Interpretación de resultados</li> <li>• Débil en cuanto la intensidad de la reacción histoquímica</li> <li>• Moderado en cuanto la intensidad de la reacción histoquímica</li> <li><b>Fuerte en cuanto la intensidad de la reacción histoquímica.</b></li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Politómica (Likert o alternativas múltiples)</b></p>
---	--	--	---	--	--

Fuente: Elaborado por el investigador de la tesis

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	INDICES (Reactivos)	ESCALA DE MEDICIÓN
<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 2</b></p> <p style="text-align: center;"><b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b></p>	<p>Chaves, D. (2014). Las pruebas determinantes de agresión sexual pueden ser orientativas, presuntivas y confirmatorias. Las pruebas orientativas son aquellos estudios de observación macroscópica de las manchas de semen con procedimientos directos e indirectos. Las pruebas presuntivas son aquellas pericias que realizan análisis cualitativos que determinan la presencia de un componente específico del fluido de interés, pero no su concentración. Las pruebas confirmatorias llamadas también específicas o de certeza pueden ser electroforéticas, enzimáticas, inmunocromatográficos y microscópico estas últimas permite la visualización microscópica del espermatozoide ya sea directa o tras una coloración utilizada para su identificación morfológica. El hallazgo de los espermatozoides microscópicamente es una prueba</p>	<p>I.M.L.P. Guía Médico Legal (2012)</p> <p>El objetivo principal del examen biológico es detectar la presencia de semen en las muestras recogidas, como prueba de actividad sexual.</p> <p>El semen tiene dos fracciones: La porción celular o espermatozoide (5% del volumen), y la porción líquida o plasma seminal (95% de volumen).</p> <p>Los espermatozoides son células móviles constituidas por una cabeza, cuello, cuerpo y cola con una longitud que varía de las 50 a 70 micras. Dado que los estudios de semen se realizan principalmente en base a la presencia de espermatozoides, es de cabal importancia el proteger las prendas que contengan a los mismos. En la búsqueda microscópica de espermatozoides en muestras de hisopados (secreción vaginal, anal, bucal), prendas, etc., el método de elección es la tinción citológica "árbol de navidad" (nuclear fast red and picroindigocarmine).</p>	<p>Estudio morfológico del espermatozoide</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Características morfológicas del espermatozoide</li> <li>• Detalle celular de la Cabeza del espermatozoide normal o con defecto morfológico.</li> <li>• Detalle celular del Acrosoma.</li> <li>• Detalle celular del Núcleo-</li> <li>• Detalle celular del citoplasma.</li> <li>• Detalle celular de la membrana citoplasmática.</li> <li>• Detalle celular del Cuello y Porción media del espermatozoide normal o con defecto morfológico</li> <li>• Detalle celular de la Cola o flagelo normal o con defecto morfológico</li> <li>• Espermatozoides morfológicamente completos.</li> <li>• Espermatozoides morfológicamente incompletos.</li> <li>• Grado de celularidad</li> <li>• Células inmaduras</li> </ul>	<p>Politémica (Likert o alternativas múltiples)</p>



<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 2</b></p> <p style="text-align: center;"><b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b></p>	<p>irrefutable de la presencia de semen en una mancha hallado en el espécimen investigado.</p>	<p>Aunque existen otros métodos de tinción descritos:</p> <p>Método de Hematoxilina-Eosina Cristal violeta Método de Papanicolaou Método de Fucsina Alcalina</p>	<p>Análisis de Identificación del espermatozoides</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustancias extracelulares del líquido seminal</li> <li>• Estudio microscópico óptico por métodos directos con muestra sin diluir.</li> <li>• Estudio microscópico con contraste de fases.</li> <li>• Estudio microscópico de fluorescencia.</li> <li>• Estudio microscopía electrónica de barrido</li> <li>• identificación de fluido seminal basados en la apariencia de las manchas</li> <li>• Tinciones supra vitales</li> <li>• Tinciones Diferenciales</li> <li>• Tinciones simples colorantes básicos</li> <li>• Tinciones policromática tipo romanowsky</li> <li>• Tinciones policromática diagnostico hematológico</li> <li>• Tinciones citológicas</li> <li>• Tinciones nucleares</li> <li>• Tinción de contraste</li> </ul>	<p>Politémica (Likert o alternativas múltiples)</p>
--	--	--	---	--	---

<p style="text-align: center;"><b>VARIABLE 2</b></p> <p style="text-align: center;"><b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b></p>			<p style="text-align: center;">muestra Forenses en la escena del crimen</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado vulvar</li> <li>• Hisopado vaginal superior</li> <li>• Hisopado vaginal inferior</li> <li>• Hisopado Orificio cervical externo</li> <li>• Lavado vaginal</li> <li>• Hisopado perianal</li> <li>• Hisopado anal</li> <li>• Hisopado bucal</li> <li>• Lavado bucal</li> <li>• Hisopado de piel</li> <li>• Búsqueda de manchas secas en diferentes tipo de soporte</li> <li>• Búsqueda de manchas liquidas en diferentes tipos de soporte</li> <li>• Búsqueda de costra en diferentes tipos de soporte</li> <li>• Ropa interior de la víctima</li> <li>• Ropa interior del sospechoso</li> <li>• Prendas de vestir</li> <li>• Papel higiénico o toallas</li> <li>• Diferentes tipos de soporte textil.</li> <li>• Objetos de transporte pequeños</li> <li>• Diferentes tipos de superficie.</li> </ul>	<p style="text-align: center;">Politómica (Likert o alternativas múltiples)</p>
--	--	--	---	---	---

Fuente: Elaborado por el investigador de la tesis

ANEXO 3

INSTRUMENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Tema: “APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.”

VARIABLE	INDICADORES	INDICES	ÍTEMS (REACTIVOS)	Escala de Medición
<p><b>VARIABLE 1 :</b></p> <p><b>Aplicando la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS</b></p> <p>Inmunocitoquímica ó inmunohistoquímica llamada también inmunotinción es un procedimiento Cito-histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar y al que se denomina antígeno. Además nos dice que estos anticuerpos están unidos a una enzima o esta puede encontrarse unida a un anticuerpo secundario que reconoce y se une al anticuerpo primario. Aplicado a un tejido orgánico o un extendido celular, el anticuerpo primario se une específicamente al sustrato (Tejido viable antigénicamente fijado en formol ó producto citológico fijado en alcohol como también tejido congelado.) y se aprovecha la actividad enzimática para visualizar la unión. El producto originado al actuar la enzima sobre el sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado, al igual que ocurre en todas las reacciones inmunológicas.</p>	<p><b>Marcador inmunocitoquímico Antígeno Prostático Específico. PSA</b></p> <p>El antígeno prostático específico (frecuentemente abreviado por sus siglas en inglés, PSA) es una sustancia proteica sintetizada por células de la próstata. Su función es la disolución del coágulo seminal. Es una glicoproteína cuya síntesis es exclusiva de la próstata. Una pequeñísima parte de este PSA pasa a la circulación sanguínea de hombres enfermos. Inicialmente se creía que se trataba de una proteína específica del semen, sin embargo, se ha determinado que se puede encontrar en múltiples tejidos, incluyendo las mamas, tumores, glándulas periuretrales, leche materna, líquido amniótico, orina femenina y el endometrio. No se ha detectado la presencia de P-30 en fluidos vaginales. Tampoco se ha identificado su presencia en el semen de otras especies animales domésticas (carnero, toro, cerdo, gato),</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> </ul>	Se puede reconocer e identificar espermatozoides microscópicamente en diferentes tipos de muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual aplicando el método inmunocitoquímico utilizando como marcador el PSA.	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frotis ó extensiones</li> </ul>	Se puede reconocer e identificar espermatozoides microscópicamente en frotis o extensiones de muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual aplicando el método inmunocitoquímico utilizando el cómo marcador PSA.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> </ul>	Será adecuado el uso de un fijador precipitante o coagulable para la conservación de los espermatozoides en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual para realizar el procesamiento del método inmunocitoquímico utilizando el marcador PSA	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método empleado (<i>Peroxidasa. antiperoxidasa</i>)</li> </ul>	El método empleado (peroxidasa, antiperoxidasa) en la inmunocitoquímica será adecuada para detectar espermatozoide microscópicamente en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual utilizando como marcador el PSA.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperación del antígeno</li> </ul>	La recuperación de antígenos permitirá que en la inmunotinción la unión con el anticuerpo sea la adecuada para detectar espermatozoide en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual utilizando como marcador el inmunocitoquímico PSA.	

<p>Las técnicas Citoquímica e Histoquímicas guardan una estrecha relación y se ocupan de investigar la actividad química que tiene lugar en las células y los tejidos. Sin embargo estas técnicas son metodologías de <u>trabajo</u> aplicadas por los Citotecnólogos e Histotecnólogos, y consiste en realizar diferentes tinciones a una porción de tejido ó células que se somete a investigación, las tinciones se emplean para <u>poder</u> apreciar las diferentes estructuras que conforman al tejido estudiado y dependiendo de la <u>estructura</u> que se desea investigar es la tinción que se va aplicar. García R. (2012).</p>	<p>aunque si se encuentra en primates tales como el orangután y macaco en rangos de concentración semejantes al humano. El fluido seminal es un buen marcador forense, ya que es estable por mucho tiempo, específico porque solo está presente en varones y su detección en concentraciones mínimas. (Dabbs, 2006)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aidez por el antígeno</li> </ul>	<p>Existirá una adecuada aidez del anticuerpo utilizado, por el antígeno recuperado en el método (peroxidasa, antiperoxidasa) en la aplicación de la inmunocitoquímica utilizando como marcador el PSA para detectar espermatozoide en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual.</p>	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad</li> </ul>	<p>La aplicación del método inmunocitoquímico alcanzará una alta sensibilidad en la detección de espermatozoide en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual utilizando como marcador inmunocitoquímico el PSA</p>	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta especificidad</li> </ul>	<p>La aplicación del método inmunocitoquímico alcanzará una alta especificidad en la detección de espermatozoide en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual utilizando como marcador el PSA</p>	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproducibilidad</li> </ul>	<p>El método inmunocitoquímico obtendrá una adecuada reproducibilidad en la detección de espermatozoide en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual utilizando como marcador inmunocitoquímico el PSA</p>	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relación entre la concentración del anticuerpo e intensidad de la reacción</li> </ul>	<p>Se logrará una adecuada relación entre la concentración del anticuerpo e intensidad de la reacción inmunocitoquímica en la detección de espermatozoide microscópicamente en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual utilizando como marcador el PSA</p>	

<p><b>Tinción citoquímica</b> <b>Ácido peryódico de SHIFF (PAS).</b></p> <p>Consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido periódico (HIO<sub>4</sub>) para incrementar el número de grupos carbonilo (aldehído o cetona) presentes en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente mediante reactivo de Schiff. Los hidratos de carbono contienen grupos carbonilos relativamente aislados, en una proporción aproximada de uno por molécula de monosacárido. Precisamente por ello es necesario oxidarlos con el fin de incrementar dichos grupos, que solo pueden ser detectados por el reactivo de Schiff si se encuentran situados en carbonos contiguos y delimitados por grupos alcohólicos o amino. Para los grupos aldehidos que aparecen en posición 1,2 glicoles estas condiciones se cumplen exclusivamente tras la oxidación del correspondiente radical hidroxilo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> </ul>	<p>Se puede reconocer e identificar espermatozoides microscópicamente en diferentes tipos de muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual aplicando el método citoquímico PAS.</p>	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frotis ó extensiones</li> </ul>	<p>Se puede reconocer e identificar espermatozoides microscópicamente en frotis o extensiones de muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual aplicando el método citoquímico PAS.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> </ul>	<p>Será adecuado el uso de un fijador precipitante o coagulable para la conservación de los espermatozoides en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual para realizar el procesamiento del método citoquímico PAS.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método citoquímico</li> </ul>	<p>El método citoquímico PAS empleado será adecuado para detectar espermatozoide microscópicamente en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidación de los carbohidratos</li> </ul>	<p>El ácido periódico producirá la oxidación de los mucopolisacaridos que se encuentra en la estructura morfológica del espermatozoide.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de los grupos aldehídos</li> </ul>	<p>La formación de los grupos aldehidos se incrementara después de la oxidación de los mucopolisacaridos que se encuentra en la estructura morfológica del espermatozoide.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción de los mucopolisacaridos con el reactivo de Schiff.</li> </ul>	<p>La reacción de los mucopolisacaridos que se encuentra en la estructura morfológica del espermatozoide con el reactivo de Schiff será observada microscópicamente.</p>	

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intensidad de la reacción</li> </ul>	La intensidad de la reacción será proporcional a la cantidad de mucopolisacáridos presentes en la estructura morfológica de los espermatozoides.	Escala de Likert Politémica
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad de la reacción</li> </ul>	Microscópicamente la aplicación del método citoquímico PAS alcanzará una alta sensibilidad de la reacción en el espermatozoide.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especificidad de la reacción</li> </ul>	Microscópicamente la aplicación del método citoquímico PAS alcanzará una alta especificidad de la reacción en el espermatozoide.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproducibilidad</li> </ul>	Microscópicamente el método citoquímico PAS obtendrá una adecuada reproducibilidad en la detección de espermatozoide en muestras forenses obtenidos en víctimas de agresión sexual.	
	<p><b>Reconocimiento y valoración Microscópica del Espermatozoide con el método de Inmunocitoquímica PSA</b></p> <p>Las secreciones de la próstata contienen varios productos químicos, de los cuales probablemente el más interesante es el antígeno específico de la próstata. El PSA es una enzima (un catalizador que favorece una mayor</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Característica microscópica del inmunotinción</li> </ul>	Es posible que al aplicar el método de la inmunocitoquímica empleando el marcador PSA analice los espermatozoides presentando las características microscópicas de la inmunotinción.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de inmunotinción</li> </ul>	La presencia de la inmunotinción empleando el marcador PSA en los espermatozoides es adecuada para su reconocimiento e identificación celular.	

<p>velocidad de las reacciones bioquímicas) de un tipo denominado coagulasa. La función primordial del PSA es licuar el semen coagulado, de modo que los espermatozoides puedan escapar de él y progresar para fertilizar el óvulo en el tracto reproductor de la mujer. Con este concepto conduyo que un espermatozoide como célula especializada, flagelada está constituido en sus tres regiones por el antígeno prostático específico PSA y este a su vez facilita que se observable microscópicamente por la unión antígeno anticuerpo con alta sensibilidad y especificidad del método permitiendo que la inmunocitoquímica sea una prueba confirmatoria en delitos sexuales.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia de inmunotinción</li> </ul>	<p>La usencia de la inmunotinción con el marcador PSA en otros componentes celulares puede ser verificada microscópicamente.</p>	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrón nuclear</li> </ul>	<p>Es posible que al aplicar el método inmunocitoquímico utilizando como marcador el PSA se observará un patrón nuclear homogéneo en los espermatozoides obtenidos en muestras forenses en víctimas de agresión sexual.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrón citoplasmático</li> </ul>	<p>La aplicación del método inmunocitoquímico utilizando como marcador el PSA se observará un patrón citoplasmático homogéneo en el espermatozoide obtenidos en muestras forenses obtenido en víctimas de agresión sexual es homogéneo.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interpretación de resultados</li> </ul>	<p>Los resultados obtenidos serán reportados:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Débil en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>○ Moderado en cuanto la intensidad de la reacción</li> <li>○ Fuerte en cuanto la intensidad de la reacción</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reactividad focal &lt;20% +</li> <li>• Reactividad variable 20 – 80% ++</li> <li>• Reactividad uniforme &gt; 80% +++</li> </ul>	

<p><b>Reconocimiento y valoración Microscópica del Espermatozoide con el método de Citoquímica PAS.</b></p> <p>Muy poco se conoce de esta proteína en el espermatozoide. Empleando una amplia batería de anticuerpos en ensayos de aglutinación de espermatozoides se encontraron resultados positivos en distintos grados de eficiencia, observando que la aglutinación de espermatozoides móviles ocurría entre cabezas, pero además entre piezas medias, formando como resultado rosetas de espermatozoides agregados.</p> <p>Se podría decir que la MUC-1 expresada en espermátide, contribuyese al glicocálix de la superficie de los espermatozoides, pudiendo además, estar implicada en fenómenos de antiadhesión entre ellos y con los tractos reproductores, al igual que ocurre con la MUC-8, o podría estar también implicada en la maduración y transporte de los espermatozoides y en el reconocimiento del óvulo por parte del espermatozoide.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Característica microscópica de la reacción Citoquímica</li> </ul>	<p>Es posible que al aplicar el método de la citoquímica PAS, analice los espermatozoides presentando las características microscópicas de la reacción citoquímica.</p>	<p><b>Escala de Likert Politómica</b></p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de la reacción Citoquímica</li> </ul>	<p>La presencia de la reacción citoquímica. PSA en los espermatozoides es adecuada para su reconocimiento e identificación celular.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia de la reacción Citoquímica</li> </ul>	<p>La ausencia de la reacción citoquímica. PSA en otros componentes celulares puede ser verificada microscópicamente.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrón nuclear</li> </ul>	<p>Es posible que al aplicar el método citoquímico PAS, se observará un patrón nuclear homogéneo en los espermatozoides obtenidos en muestras forenses en víctimas de agresión sexual.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrón citoplasmático</li> </ul>	<p>Es posible que al aplicar el método citoquímico PAS, se observará un patrón citoplasmático homogéneo en el espermatozoide obtenidos en muestras forenses obtenido en víctimas de agresión sexual es homogéneo.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interpretación de resultados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Débil en cuanto la intensidad de la reacción citoquímica PAS en los espermatozoides</li> <li>○ Moderado en cuanto la intensidad de la reacción citoquímica PAS en los espermatozoides</li> <li>○ Fuerte en cuanto la intensidad de la reacción citoquímica PAS en los espermatozoides</li> </ul>	



VARIABLE	INDICADORES	INDICES	ITEMS (REACTIVOS)	Escala de Medición
<p><b>VARIABLE 2</b></p> <p><b>Reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses.</b></p> <p>Las pruebas determinantes de agresión sexual pueden ser orientativas, presuntivas y confirmatorias. Las pruebas orientativas son aquellos estudios de observación macroscópica de las manchas de semen con procedimientos directos e indirectos. Las pruebas presuntivas son aquellas pericias que realizan análisis cualitativos que determinan la presencia de un componente específico del fluido de interés, pero no su concentración. Las pruebas confirmatorias llamadas también específicas o de certeza pueden ser electroforéticas, enzimáticas, inmunocromatográficos y microscópico estas últimas permite la visualización microscópica del espermatozoide ya sea</p>	<p><b>Estudio morfológico del espermatozoide por microscopia</b></p> <p>Para poder observar e identificar los espermatozoides es necesario hacer uso del microscopio, previo haber realizado un extracto del indicio a investigar, del cual se realiza un frote en una laminilla de vidrio llamada portaobjetos, el cual es coloreado con una tinción especial.</p> <p><b>Característica morfológica</b></p> <p>Cabeza oval de 4 a 6 micras contiene material genético haploide y acrosoma. Su cola constituye en 90% del total de largo. Su función es la motilidad, contiene las mitocondrias. Especies con morfología similar, conejo, primates camero.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Características morfológicas del espermatozoide.</li> </ul>	Se puede reconocer las características morfológicas del espermatozoide por microscopía.	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular de la Cabeza del espermatozoide normal ó con defecto morfológico.</li> </ul>	Se puede observar microscópicamente el detalle celular de la Cabeza del espermatozoide normal ó con defecto morfológico.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular del Acrosoma.</li> </ul>	Se puede observar el detalle celular del Acrosoma del espermatozoide por microscopía	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular del Núcleo</li> </ul>	Se puede observar el detalle celular del núcleo del espermatozoide por microscopía.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular del citoplasma.</li> </ul>	Se puede observar el detalle celular del citoplasma del espermatozoide por microscopía.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular de la membrana citoplasmática.</li> </ul>	Se puede observar el detalle celular de la membrana citoplasmática del espermatozoide por microscopía.	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular del Cuello y Porción media del espermatozoide normal ó con defecto morfológico</li> </ul>	Se puede observar el detalle celular del Cuello y Porción media del espermatozoide normal ó con defecto morfológico por microscopía	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detalle celular de la Cola ó flagelo normal o con defecto morfológico</li> </ul>	Se puede observar el detalle celular de la Cola ó flagelo normal o con defecto morfológico por microscopía	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espermatozoides morfológicamente completos.</li> </ul>	Se puede observar los espermatozoides morfológicamente completos por microscopía			

<p>directa o tras una coloración utilizada para su identificación morfológica.</p> <p>El hallazgo de los espermatozoides microscópicamente es una prueba irrefutable de la presencia de semen en una mancha hallado en el espécimen investigado. <b>Chaves, D. (2014).</b></p>	<p><b>Estudio Criminalística</b></p> <p>En la búsqueda microscópica del espermatozoide, los encontramos completo, cabeza y cola, en frotis en fresco realizados directamente de la toma de la muestra en víctimas. Encontramos solamente la cabeza, cuando se trata de frotis realizados de muestras tomadas de indicios, del cual se toma un pedazo para su extracción y después centrifugación, para concentración de la misma.</p> <p><b>Cisneros &amp; Villarroel, (2016)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espermatozoides morfológicamente incompletos.</li> </ul>	Se puede observar los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía	<p><b>Escala de Likert Poltómica</b></p>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grado de celularidad</li> </ul>	Se puede obtener el grado de celularidad por microscopía	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células inmaduras</li> </ul>	Se puede hallar las células inmaduras mediante la microscopía	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustancias extracelulares del líquido seminal</li> </ul>	Se puede encontrar las sustancias extracelulares del líquido seminal por microscopía.	
	<p><b>Procesamiento de obtención de muestras en diferentes zonas anatómicas del líquido seminal para la identificación de los espermatozoides.</b></p> <p>En la investigación biológica forense se analizan los hisopos y/o indicios en la búsqueda de presencia de semen. La persistencia de semen después de una supuesta agresión sexual varía entre víctimas y está influenciada por las actividades que realiza la víctima después del hecho (ducha, higiene genital, otros). Evidentemente, constituye solo una evidencia en la investigación de agresión sexual.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado vulvar</li> </ul>	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado vulvar en víctimas de agresión sexual	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado vaginal superior</li> </ul>	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado vaginal superior en mujeres víctimas de agresión sexual	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado vaginal inferior</li> </ul>	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado vaginal inferior en mujeres víctimas de agresión sexual	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado Orificio cervical externo</li> </ul>	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado orificio cervical externo en mujeres víctimas de agresión sexual	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavado vaginal</li> </ul>	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en lavado vaginal en mujeres víctimas de agresión sexual	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado perianal</li> </ul>	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias		

<p>El semen se puede detectar en muestras vaginales tomadas hasta aproximadamente cuatro días después del coito; En la mayoría de los casos, sin embargo, no se detecta en muestras tomadas más allá de las 48 horas después del coito. 133 La literatura refiere que se puede recuperar evidencia de semen hasta una semana después. En el recto y la boca el semen se mantiene durante períodos mucho más cortos de tiempo.135 Por lo general, no se encuentra en hisopados anales después de 24 horas del supuesto incidente, pero las muestras se analizan hasta 72 horas después. En las muestras de cavidad oral se encuentra semen raramente después de las 6 horas del supuesto incidente. Sin embargo, se recomienda tomar hisopados de la cavidad oral hasta las 24 horas posteriores a la supuesta agresión sexual con sexo oral.</p> <p><b>Instituto de medicina legal del Perú, (2012), págs. 94-106</b></p>		encontradas en hisopado perianal en víctimas de agresión sexual	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
	• Hisopado anal	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado anal en víctimas de agresión sexual	
	• Hisopado bucal	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado bucal en víctimas de agresión sexual	
	• Lavado bucal	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en lavado bucal en víctimas de agresión sexual	
	• Hisopado de piel	Se puede determinar la presencia de espermatozoides microscópicamente mediante muestras o evidencias encontradas en hisopado de piel en víctimas de agresión sexual	

<p><b>Muestra Forenses en la escena del crimen</b></p> <p>Protocolo de recolección de indicios biológicos en delitos sexuales. En casos en los que se presume un delito sexual, el semen puede buscarse en la ropa de la presunta víctima y/ o cadáver</p> <p>Existen muchos casos en los que los fluidos biológicos como el semen se deben retirar de los diferentes soportes sólidos (prendas de vestir, sábanas, toallas, papel y otros). Para estos casos, debemos recurrir a un procedimiento llamado levantamiento de evidencias en donde recuperamos los fluidos biológicos para su respectivo estudio. <b>Estévez, (2011)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de manchas secas de semen en diferente tipo de soporte.</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda de manchas secas de semen en diferentes tipos de soporte en la escena del crimen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	<p><b>Escala de Likert Politémica</b></p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de manchas líquidas de semen en diferente tipo de soporte.</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda de manchas líquidas de semen en diferentes tipos de soporte en la escena del crimen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de costra de semen en diferente tipo de soporte.</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda de costra de semen en diferentes tipos de soporte en la escena del crimen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de semen en la ropa interior de la víctima</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda en la ropa interior de la víctima, semen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de semen en la ropa interior del sospechoso</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda en la ropa interior del sospechoso, semen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de semen en la Prendas de vestir de la víctima ó sospechoso</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda en las prendas de vestir de la víctima ó sospechoso semen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de semen en el papel higiénico ó toallas en la escena del crimen.</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda en el papel higiénico ó toallas en la escena del crimen, semen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de semen en diferentes tipos de soporte textil</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda en diferentes tipos de soporte en la escena del crimen, semen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico.</p>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de semen en diferentes tipos de superficie</li> </ul>	<p>Se puede realizar la búsqueda en diferentes tipos de superficie en la escena del crimen, semen para determinar microscópicamente el hallazgo de espermatozoides por el método inmunocitoquímico y Citoquímico</p>	

Fuente: Elaborado por el investigador de la tesis

**ANEXO 4**

**CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DEL INSTRUMENTO QUE MIDE LA "APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN 2017."**

N°	Dimensiones/Ítems	Pertinencia <sup>1</sup>		Relevancia <sup>2</sup>		Claridad <sup>3</sup>		Sugerencias
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	
D1	<b>Marcador Inmunocitoquímico Antígeno Prostático Específico (PSA).</b>							
1	¿Existe forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?							
2	¿Existe forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?							
3	¿Existe diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?							
4	¿La aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente?							
D2	<b>Técnica Citoquímica Ácido peryódico de SHIFF (PAS)</b>							
5	¿Existe forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?							
6	¿Existe forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides							

<sup>1</sup> Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado

<sup>2</sup> Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o indicador específica del constructo

<sup>3</sup> Claridad: Transparencia y entendimiento del concepto.

	microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?						
D3	<b>Reconocimiento y valoración citológica de los Espermatozoides con el método de Inmunocitoquímica PSA</b>						
7	¿Existe la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?						
8	¿Existe la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?						
D4	<b>Reconocimiento y valoración citológica de los Espermatozoide con el método de Citoquímica PAS</b>						
9	¿Existe la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la citoquímica PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?						
10	¿Existe la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?						
D5	<b>Estudio morfológico del espermatozoide por microscopía</b>						
11	¿Existe forma de verificar el reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopía en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?						
12	¿La observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen microscopía en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?						
13	¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra al aplicar las						

	técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
14	¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por el agresor en este caso el volumen de semen eyaculado al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
15	¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
D6	<b>Procesamiento de obtención de muestras en diferentes zonas anatómicas del líquido seminal para la identificación de los espermatozoides</b>							
16	¿Existe forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
17	¿Existe forma de estudiar la evidencia de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS mediante la técnica del doble hisopado cuya procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable?							
18	¿Existe forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
19	¿El material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
D7	<b>Muestra Forenses en la escena del crimen</b>							
20	¿Existe forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sabanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza							

	evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
21	¿Existe forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?							
22	¿Existe la manera de analizar por las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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?							
23	¿Existe la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado?							
24	¿Es importante que los procedimientos posterior a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es importante proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico?							

Observaciones (precisar si hay suficiencia): .....

Opinión de aplicabilidad:           Aplicable ( )           Aplicable después de corregir ( )           No aplicable ( )

Apellidos y nombre del evaluador (juicio de experto): ..... DNI: .....

Especialidad del evaluador: Mg. ó Dr.....

Firma: .....



23	¿Existe la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado?	✓		✓		✓		
24	¿Es importante que los procedimientos posterior a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es importante proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico?	✓		✓		✓		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): .....

Opinión de aplicabilidad:      Aplicable (X)      Aplicable después de corregir ( )      No aplicable ( )

Apellidos y nombre del evaluador (juicio de experto): *Quispe Asto Cesar* DNI: *08597036*

Especialidad del evaluador: Mg. ó Dr. *Especialista en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica*

Firma: .....



-----  
 Lid. TM Cesar Quispe Asto  
 Presidente de Histotecnologías:  
 Sociedad de Tecnologías Médicas Perú

23	¿Existe la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado?	X		X		X	
24	¿Es importante que los procedimientos posterior a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es importante proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico?	X		X		X	

Observaciones (precisar si hay suficiencia): .....

Opinión de aplicabilidad:           Aplicable (X)           Aplicable después de corregir ( )           No aplicable ( )

Apellidos y nombre del evaluador (juicio de experto): Palacios Butron Fernando S. ..... DNI: 06987648

Especialidad del evaluador: Mg. ó Dr. .... Mg. Salud Pública .....

Firma: ..... COLEGIO TECNÓLOGO MÉDICO DEL PERÚ

  
 -----  
 Lic. Fernando S. Palacios Butron

24	¿Es importante que los procedimientos posterior a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es importante proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico?	X		X		X		
----	--	---	--	---	--	---	--	--

Observaciones (precisar si hay suficiencia): .....

Opinión de aplicabilidad:      Aplicable       Aplicable después de corregir ( )      No aplicable ( )

Apellidos y nombre del evaluador (juicio de experto): ..... ASCARZA GALLEGOS ANGELO ..... DNI: 06788383

Especialidad del evaluador: Mg. ó Dr. .... ESPECIALISTA EN LABORATORIO FORENSE .....

Firma:  .....

T.M. ANGELO ASCARZA GALLEGOS  
 Coordinador del Laboratorio de Criminalística  
 Instituto de Medicina Legal del Callao

## ANEXO 5.

### CUESTIONARIO DE INSTRUMENTO: APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL, DIRIGIDO A LOS TECNÓLOGOS MÉDICOS ESPECIALISTAS EN LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA.

Estimado colega, la Institución requiere conocer su opinión sobre la forma en que se desarrolla en el Hospital el proceso de la Inmunocitoquímica y citoquímica para identificar las debilidades y trabajar en muestras forenses y mejorarlas.

A continuación, le presentamos el cuestionario sobre la investigación titulada “**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.**”, las respuestas que desarrolle, son confidenciales, por lo tanto, le solicitamos, responder con honestidad y marcar con una X (aspa) en la casilla que muestre la alternativa que represente su opinión.

1	2	3	4	5
Indeciso	Totalmente en desacuerdo	En desacuerdo	De acuerdo	Totalmente de acuerdo

Sexo: ... Edad: ...

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL						
Dimensión: Marcador Inmunocitoquímico Antígeno Prostático Específico (PSA).						
N°	PREGUNTAS	1	2	3	4	5
1	<i>¿Existe forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método inmunocitoquímico con el</i>					

	<i>uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
2	<i>¿Existe forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
3	<i>¿Existe diferencia entre el procedimiento manual y automatizado al aplicar el método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
4	<i>¿La aplicación del método inmunocitoquímico con el uso del marcador PSA que evidencia la reacción antígeno anticuerpo de los espermatozoides, puede también evidenciar el líquido seminal microscópicamente?</i>					
<b>Dimensión: Técnica Citoquímica Ácido peryódico de SHIFF (PAS)</b>						
<b>N°</b>	<b>PREGUNTAS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
5	<i>¿Existe forma de evidenciar microscópicamente los espermatozoides aplicando el método citoquímico PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
6	<i>¿Existe forma de evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, la búsqueda de espermatozoides microscópicamente aplicando el método citoquímico PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
<b>Dimensión: Valoración citológica de los Espermatozoides con el método de Inmunocitoquímica PSA</b>						
<b>N°</b>	<b>PREGUNTAS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
7	<i>¿Existe la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la inmunocitoquímica utilizando el marcador PSA en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
8	<i>¿Existe la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción inmunocitoquímica del marcador PSA con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
<b>Dimensión: Valoración citológica de los Espermatozoide con el método de Citoquímica PAS</b>						

N°	PREGUNTAS	1	2	3	4	5
9	<i>¿Existe la forma de interpretar citológicamente la característica microscópica de los espermatozoides con la citoquímica PAS en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
10	<i>¿Existe la forma de interpretar citológicamente la presencia o ausencia reacción citoquímica PAS con los espermatozoides provenientes de muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual?</i>					
<b>RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES</b>						
<b>Dimensión: Estudio morfológico del espermatozoide por microscopía</b>						
N°	PREGUNTAS	1	2	3	4	5
11	¿Existe forma de verificar el reconocimiento e identificación del espermatozoide morfológicamente por microscopía en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?					
12	¿La observación de los espermatozoides morfológicamente incompletos por microscopía es la prueba irrefutable de semen <i>microscopia</i> en muestras forenses obtenidas en víctimas de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?					
13	<i>¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por la circunstancia o tiempo transcurrido desde la eyaculación durante la agresión sexual hasta la recolección de la muestra al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
14	¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por el agresor en este caso el volumen de semen eyaculado al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?					
15	<i>¿Existe la forma de verificar los factores que influyen la determinación de espermatozoides por microscopía; ya sea por la víctima en este caso la dilatación del cérvix, cantidad y calidad del moco cervical al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
<b>Dimensión: Procesamiento de obtención de muestras en diferentes zonas anatómicas del líquido seminal para la identificación de los espermatozoides</b>						

N°	PREGUNTAS	1	2	3	4	5
16	<i>¿Existe forma de analizar mediante hisopados de manchas secas o húmedas de semen, obtenidas en muestras forenses pertenecientes a víctimas de agresión sexual la evidencia del delito al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
17	<i>¿Existe forma de estudiar la evidencia de agresión sexual al aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS mediante la técnica del doble hisopado cuya procedimiento es utilizada para el recojo de muestras de la superficie de la piel u otro soporte no transportable?</i>					
18	<i>¿Existe forma de analizar la evidencia de agresión sexual en muestras recolectadas en todas las áreas de la piel sin lavar, que haya sido eyaculado por el agresor a la víctima mediante la técnica del doble hisopado para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
19	<i>¿El material seminal encontrado en cavidades u orificios como la vagina, recto, dependerá de coleccionar muestra en un tiempo adecuado para el reporte y aislamiento espermatozoides para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
<b>Dimensión: Muestra Forenses en la escena del crimen</b>						
N°	PREGUNTAS	1	2	3	4	5
20	<i>¿Existe forma de hallar evidencias de agresión sexual en las manchas de semen que se encuentran en prendas (ropas, sábanas, fundas, almohadas, toallas) recolectando toda pieza evitando dobleces y fricciones en las áreas manchadas para aplicar las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
21	<i>¿Existe forma de hallar evidencias de agresión sexual en las prendas de vestir, del presunto agresor y/o de la presunta víctima, del cual deben ser empaquetadas en forma separada para su estudio inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS para su confirmación?</i>					
22	<i>¿Existe la manera de analizar por las técnicas inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS la evidencia del líquido espermático en la escena del crimen por el investigador en las cuatro formas distintas que se presenta: 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?</i>					

23	¿Existe la forma que las manchas seminales sean localizadas, protegidas y transportadas para su análisis inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en laboratorio, para ello es importante conservar completa la célula, es decir que la cabeza se mantenga unida a la cola, por lo que debe evitarse fricciones o manipuleo inadecuado?				
24	<i>¿Es importante que los procedimientos posterior a la toma de muestra, realizado el hisopado de la región corporal es trascendental proceder al extendido del mismo en una lámina portaobjeto estéril del cual es necesario fijar en alcohol absoluto para su procedimiento inmunocitoquímico y citoquímico?</i>				

**GRACIAS POR SU COLABORACIÓN**

Fuente: Elaborado por el investigador de la tesis





ANEXO 6

CARRO

‘Año del diálogo y reconciliación nacional’

Callao 13 de marzo del 2018

**Dra. Maritza Hipólito Pittar**

**Jefa del Servicio de Patología Quirúrgica.**

**Asunto: Autorización para el cuestionario de Instrumento aplicado para Tecnólogos Médicos**

Nos es muy grato comunicarnos con usted para expresarle nuestros saludos y así mismo, hacer de su conocimiento que como estudiante de la Escuela de Posgrado de la Universidad Privada Norbert Wiener, de la especialidad de Ciencias Criminalísticas, le solicito su valiosa colaboración y **autorización para el cuestionario aplicado para Tecnólogos Médicos** para recabar la información requerida para llevar a cabo el desarrollo de mi tema de investigación y con el cuál optaré el grado de Maestro en Ciencias Criminalísticas.

El título correspondiente a mi tema de investigación es **“APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.”** y siendo indispensable contar con la aplicación del cuestionario contando con todos los Licenciados Tecnólogos Médicos de los servicios correspondientes de Patología donde sus observaciones y recomendaciones contribuirán para mejorar la versión final de mi trabajo.

El expediente de validación, que le hacemos llegar contiene:

Anexo N° 1: Carta de presentación

Anexo N° 5: Instrumento aplicado para Tecnólogos Médicos |

Expresándole nuestros sentimientos de respeto y consideración nos despedimos de usted, no sin antes agradecerle por su atención y contribución al mejoramiento de la investigación científica.

Atentamente:

**LIC. CARLOS HUGO GARCIA VASQUEZ**

**DNI: 09435522**

## Anexo N° 7:

### Matriz de consistencia: “APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LA INMUNOCITOQUÍMICA PSA Y CITOQUÍMICA PAS PARA EL RECONOCIMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS FORENSES POR VIOLENCIA SEXUAL EN EL HOSPITAL NACIONAL ALBERTO SABOGAL SOLEGUREN, 2017.”

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES E INDICADORES	METODOLOGIA
<p><b>Problema General.</b></p> <p>¿Qué relación existe entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <p>Determinar la relación que existe entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017</p>	<p><b>Hipótesis General</b></p> <p><b>H1:</b> Existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.</p> <p><b>H0:</b> No existe significativa relación entre la aplicación de las técnicas de la inmunocitoquímica PSA y citoquímica PAS en el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.</p>	<p><b>Variable 1 (x)</b></p> <p>Aplicación de las técnicas de la Inmunocitoquímica PSA y Citoquímica PAS</p>	<p><b>DV1-1:</b> <b>Marcador Inmunocitoquímico Antígeno Prostático Específico PSA</b></p> <p><b>IV1-1:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> <li>• Frotis ó extensiones</li> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> <li>• Método empleado (<i>Peroxidasa anti-peroxidasa</i>)</li> <li>• Recuperación del antígeno</li> <li>• Avidéz por el antígeno</li> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Alta especificidad</li> <li>• Reproducibilidad</li> <li>• Relación entre la concentración del anticuerpo e intensidad de la reacción.</li> </ul> <p><b>DV1-2:</b> <b>Técnica Citoquímica Ácido peryódico de SHIFF PAS</b></p> <p><b>IV1-2:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tipos de muestra</li> <li>• Frotis ó extensiones</li> <li>• Fijador precipitante o coagulable</li> <li>• Método químico colorimétrico</li> <li>• Oxidación de los carbohidratos</li> <li>• Formación de los grupos aldehídos</li> <li>• Reacción de mucopolisacaridos</li> <li>• Intensidad de la reacción</li> <li>• Especificad de la reacción</li> </ul>	<p><b>Tipo de investigación:</b> aplicada</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> Correlacional.</p> <p><b>Métodos:</b> Correlacional.</p> <p><b>Diseño:</b> No Experimental</p> <p><b>Técnicas:</b> Observación Escala de Likert</p> <p><b>Instrumento:</b> Escala de Likert Aplicación de instrumento para recolección de datos</p>
<p><b>Problemas específicos</b></p> <p>1. ¿Cómo se relaciona la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017?</p>	<p><b>Objetivos Específicos</b></p> <p>1. Determinar la relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.</p>	<p><b>Hipótesis Específicas</b></p> <p>1. Es evidente la alta relación entre la aplicación de la inmunotinción del antígeno prostático específico PSA con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Sologuren, 2017.</p>			

<p>2. ¿Cómo se relaciona la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017?</p> <p>3. ¿Qué relación existe entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017?</p> <p>4. ¿Qué relación existe entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017?</p>	<p>2. Determinar la relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p> <p>3. Evaluar la relación que existe entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p> <p>4. Evaluar la relación que existe entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS para el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p>	<p>2. Es evidente la alta relación entre la aplicación de la tinción Citoquímica de ácido peryódico de Shiff PAS con el estudio morfológico del espermatozoide por microscopia en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p> <p>3. Es notoria la alta relación entre la interpretación citológica de la inmunotinción PSA con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p> <p>4. Es evidente la alta relación entre la interpretación citológica de la tinción Citoquímico PAS con el reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual en el Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad de la reacción</li> <li>• Reproducibilidad</li> </ul> <p><b>DV1-3:</b> <b>Valoración citológica de los Espermatozoide con el método de Inmunocitoquímica PSA</b></p> <p><b>IV1-3:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Característica microscópica del inmunotinción</li> <li>• Presencia de inmunotinción</li> <li>• Ausencia de inmunotinción</li> <li>• Localización extracelular de la inmunotinción</li> <li>• Patrón nuclear (cabeza)</li> <li>• Patrón citoplasmático (cola)</li> <li>• Interpretación de resultados</li> <li>• Reactividad</li> </ul> <p><b>DV1-4:</b> <b>Valoración citológica de l Espermatozoide con el método de Citoquímica PAS.</b></p> <p><b>IV1-4:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Característica microscópica de la reacción histoquímica</li> <li>• Presencia de la reacción histoquímica</li> <li>• Ausencia de la reacción histoquímica</li> <li>• Localización celular de la reacción histoquímica</li> <li>• Localización extracelular de la reacción histoquímica</li> <li>• Patrón nuclear (cabeza)</li> <li>• Patrón citoplasmático (cola)</li> <li>• Interpretación de resultados</li> </ul>	<p>(cuestionario de 24 preguntas)</p> <p><b>Población:</b> Totalidad de los casos atendidos por violencia sexual, en el servicio de Ginecología del Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017</p> <p><b>Muestra:</b> La muestra estuvo constituida por 87 pacientes atendidos por violencia sexual, en el servicio de Ginecología del Hospital Nacional Alberto Sabogal Soleguren, 2017.</p> <p><b>Muestreo</b> Probabilístico donde el criterio de clasificación de la población, se sustentó en un muestreo probabilístico aleatorio simple, porque las muestras fueron</p>
---	--	--	--	---	---

			<p style="text-align: center;"><b>Variable 2 (y)</b></p> <p><b>reconocimiento e identificación de espermatozoides en muestras forenses por violencia sexual</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>DV2-1:</b> <b>Estudio morfológico del espermatozoide por microscopía</b></p> <p style="text-align: center;"><b>IV2-1:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Características morfológicas del espermatozoide</li> <li>• Detalle celular de la Cabeza del espermatozoide normal ó con defecto morfológico.</li> <li>• Detalle celular del Acrosoma.</li> <li>• Detalle celular del Núcleo-</li> <li>• Detalle celular del citoplasma.</li> <li>• Detalle celular de la membrana citoplasmática.</li> <li>• Detalle celular del Cuello y Porción media del espermatozoide normal ó con defecto morfológico</li> <li>• Detalle celular de la Cola ó flagelo normal o con defecto morfológico</li> <li>• Espermatozoides morfológicamente completos.</li> <li>• Espermatozoides morfológicamente incompletos.</li> <li>• Grado de celularidad</li> <li>• Células inmaduras</li> <li>• Sustancias extracelulares del líquido seminal</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>DV2-2:</b> <b>Procesamiento de obtención de muestras en diferentes zonas anatómicas del líquido seminal para la Identificación de los espermatozoides</b></p> <p style="text-align: center;"><b>IV2-2:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado vulvar</li> <li>• Hisopado vaginal superior</li> <li>• Hisopado vaginal inferior</li> <li>• Hisopado Orificio cervical externo</li> <li>• Lavado vaginal</li> <li>• Hisopado perianal</li> </ul>	<p style="text-align: center;">seleccionadas al azar.</p>
--	--	--	---	--	---

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hisopado anal</li> <li>• Hisopado bucal</li> <li>• Lavado bucal</li> <li>• Hisopado de piel</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>DV2-3:</b> <b>Muestra Forenses en la escena del crimen</b></p> <p style="text-align: center;"><b>IV2-3:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de manchas secas en diferentes tipo de soporte</li> <li>• Búsqueda de manchas liquidas en diferentes tipo de soporte</li> <li>• Búsqueda de costra en diferentes tipo de soporte</li> <li>• Ropa interior de la víctima</li> <li>• Ropa interior del sospechoso</li> <li>• Prendas de vestir</li> <li>• Papel higiénico ó toallas</li> <li>• Diferentes tipos de soporte textil.</li> <li>• Objetos de transporte pequeños</li> <li>• Diferentes tipos de superficie.</li> </ul>	
--	--	--	--	--	--

**ANEXO 8**  
**FOTOS DE ESTUDIO ANALÍTICO**

