

ESCUELA: CENS N° 74 Juan Vucetich

AÑO: 3ero.

TURNO: Nocturno

ÁREA CURRICULAR: Química Criminalística

TÍTULO DE LA PROPUESTA: Identificación de manchas de semen

CONTENIDO SELECCIONADO: Características del semen, su búsqueda en el lugar del hecho, distintos análisis para su identificación

ANÁLISIS PERICIAL DE MANCHAS SEMINALES

El material bajo pericia suele ser de lo más variado, es habitual trabajar con:

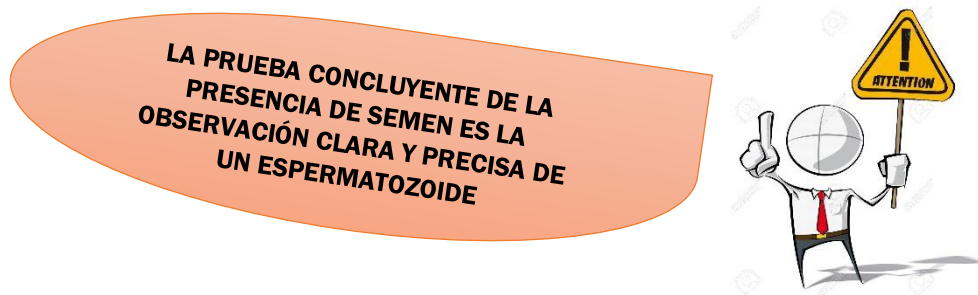
- ✓ ropa interior de la víctima y sospechado
- ✓ ropas de cama, toallas, alfombras y material de tapicería en general, etc.
- ✓ En ocasiones debe efectuarse con exudados vaginales o rectales, o hisopos obtenidos luego del levantamiento de dichos rastros.
- ✓ Otras veces es necesario trasladarse al lugar del hecho para realizar la observación sobre pisos, escaleras, interior de vehículos, etc.

En función de la porosidad del soporte las manchas de semen pueden presentar distintas características:

- en **materiales absorbentes** las manchas presentan un color grisáceo que se amarillenta con el tiempo, con bordes irregulares. Si el soporte es flexible, caso de las telas, estas adquieren una consistencia apergaminada al tacto, por el gran tenor de hidratos de carbono presentes en el semen.
- Si el soporte **no es absorbente**, el semen al secarse deja un residuo constituido por una película o escamas brillantes que se pueden retirar por raspados con elementos adecuados.

Cuando deben revisarse grandes superficies sospechadas es conveniente la utilización de una **lámpara UV**, las manchas de semen suelen presentar una **fluorescencia amarillenta**, pero tal característica no es exclusiva, por lo que el análisis químico posterior será el que determinará su naturaleza. En numerosos casos las fluorescencias típicas de los soportes enmascaran esa característica y en esos casos se verán manchas opacas sobre fondo con fluorescencia. **La fluorescencia es independiente de la presencia o no de espermatozoides.**

Localizadas las manchas debe realizarse un EXAMEN ANALÍTICO-PERICIAL → **identificación de uno o más componentes del esperma**



Pueden presentarse trabas de orden práctico:

- Que el autor del hecho sea azoospermico u oligozoospermico o esté vasectomizado
- Si es una muestra vaginal → que haya pasado mucho tiempo o la víctima se haya lavado
- Manchas secas → fragilidad del espermatozoide provoca separación de cabeza y cola

Existen otras formas de investigar el espermatozoide que no impliquen la visualización del espermatozoide



Búsqueda directa o indirecta de sustancias que constituyen la compleja composición del semen



	Métodos micro-cristalográficos Métodos cromatográficos Métodos enzimáticos Métodos inmunológicos	
--	---	--

REACCIONES DE ORIENTACIÓN

1- MÉTODOS MICRO-CRISTALOGRAFICOS

Reacción de Florence

Se basa en la **formación de cristales de Yoduro de colina**, como ya se ha mencionado la colina se encuentra en la composición normal del espermatozoide en forma de fosforil colina y de lecitina. El reactivo de Florence está constituido por una solución de Yodo metálico y yoduro de potasio en agua destilada.

El material a analizar, obtenido por raspado o por disolución según la naturaleza del soporte, se coloca sobre un portaobjetos, en el segundo caso se deposita una gota de la solución y se deja secar sobre el mismo. A continuación se cubre con un

cubreobjetos, y finalmente por capilaridad se agrega entre porta y cubre una gota del reactivo, se deja en reposo, no más de 20 minutos (pues los cristales pueden redisolverse) y se observa al microscopio. La presencia de unos cristales laminares de color pardo indican la formación de yoduro de colina.



Reacción de Barberio

Se basa en la **formación de cristales de picrato de espermita**, hemos mencionado que la misma se encuentra en el semen como fosfato de espermita en cantidades importantes aunque no es exclusiva del semen. El reactivo de Barberio está constituido por una solución saturada de ácido pícrico. La técnica de la reacción es similar a la anterior y se obtienen cristales fusiformes refringentes de color amarillo.

2- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Los ensayos cromatográficos ya sea sobre papel o placa fina, constituyen una buena técnica para poner en evidencia la presencia de algunas sustancias que se encuentran presentes en el semen. Dichos ensayos se realizan con líquidos resolutivos adecuados, simultáneamente con testigo de esperma humano indubitable o de sustancias puras componentes normales del semen, como tales habitualmente se utilizan las bases nitrogenadas, colina y espermina y una enzima, la fosfatasa ácida.

Si bien es cierto que ninguna de tales sustancias son específicas y por lo tanto concluyentes, su ausencia nos permitirá descartar la presencia de semen y la presencia de ellas simultáneamente se convierten en resultados altamente sugestivos.

Para investigar las bases nitrogenadas, se utiliza Ácido clorhídrico 1 N como líquido resolutivo y posterior revelado secuencial con Reactivo de Draggendorf para la colina y solución de iodoplatinato de potasio para la espermita. El revelado se realizará de manera secuencial, **en caso positivo para colina aparecerán manchas rojizas** y con el iodoplatinato aparecen **manchas violáceas en caso positivo para espermina**.



3- MÉTODOS ENZIMÁTICOS

La fosfatasa acida prostática, se origina en la próstata y tiene en el plasma seminal la función de desdoblar la fosforil colina en radicales fosfatos y la base orgánica colina. El nivel de la actividad de la fosfatasa ácida es 500 a 1000 veces más alta en el semen humano que en otros fluidos o secreciones corporales, por lo que la detección de su actividad es considerada como un rápido y confiable indicador de la presencia de semen.

La acción hidrolítica de la fosfatasa ácida se puede evidenciar detectando el ácido fosfórico liberado o la sustancia orgánica base utilizada como sustrato. El fosfato de fenoltaleína, fosforil colina, fenilfosfato de sodio, alfa naftilfosfato, fosfato de nitrofenol, todos ellos por la hidrólisis enzimática generan productos coloreados o fluorescentes.

Fosfatasa acida



Para realizar el ensayo se utiliza un papel de filtro humedecido con una solución buffer sobre la muestra de presunta naturaleza seminal, la presión aplicada da lugar a la transferencia de la muestra de semen hacia el papel (si éste está presente), luego se emplea el reactivo (alfa- naftilfosfato u otro). Si se observa coloración, hay presencia de fosfatasa acida prostática.

4- MÉTODOS INMUNOLOGICOS

La *proteína p30* fue descubierta en 1970, recibió ese nombre debido a que durante su caracterización se descubrió que su peso molecular es de 30000 Dalton. Posteriormente, se le denominó también *Antígeno Prostático (PSA)* ya que se ha venido utilizando como marcador del cáncer de próstata.

Durante sus primeras aplicaciones se pensó que la proteína p30 se encontraba de forma exclusiva en la glándula prostática, pero estudios posteriores demostraron su presencia en la leche materna, en la orina, en el líquido amniótico y en otros fluidos, sin embargo, la concentración de la enzima en estos casos es considerablemente menor que la hallada en el semen, ya que en éste su promedio es de unos 820.000 ng/ml mientras que en otros fluidos biológicos oscila entre 0,1 y 2 ng/ml.

El **inmunoensayo** es un método alternativo rápido y fiable de detección de PSA. Para este fin, se utilizan kits comerciales que utilizan anticuerpos monoclonales del antígeno prostático previamente enlazados con partículas teñidas, los cuales se adhieren a la proteína p30 presente en las 5 gotas del fluido a identificar. Los anticuerpos junto al antígeno prostático o proteína p30 dan como resultado un complejo anticuerpo-

antígeno. Ese complejo migra a través de la membrana del dispositivo hasta el área de prueba (T) y el área control (C), donde será verificable a simple vista por la aparición de una línea de color rosado tanto en el área “T” como en el área “C”, con lo cual se entiende como un resultado positivo para la presencia de la proteína p30. Si únicamente se colorea la línea del área “C”, el resultado es negativo, lo cual daría fe no solo de la ausencia de la proteína p30 sino también del buen funcionamiento de la prueba.

Las etapas para la realización del inmunoensayo son las siguientes:

- ✓ Si la muestra se encuentra seca, debe ser incubada en agua o solución salina hasta que se haya rehidratado, lo cual generalmente ocurre en unas 2 horas.
- ✓ Posteriormente, la muestra se somete a un proceso de centrifugación para separarle del soporte o material en el que se encuentra, de tal manera que la muestra se conserva en estado líquido y ya no como una mancha seca adherida a una superficie.
- ✓ Una vez concluida la centrifugación de la muestra se puede proceder a analizar el sobrenadante resultante de esta para determinar si contiene proteína p30. Para ello se toman sólo aproximadamente 200 µl, lo cual equivale a unas 8 gotas, y se colocan en la membrana porosa de la sección “S” del dispositivo de prueba.



PRUEBAS DE CERTEZA

1- OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE ESPERMATOZOIDES

Observación microscópica directa

El reconocimiento de un espermatozoide en una mancha es una prueba irrefutable de la presencia de semen. Esta visualización es fácil en manchas frescas, especialmente si dicho líquido aún no se ha secado totalmente, gracias a la morfología característica del espermatozoide y a su movimiento típico. Por el contrario en manchas secas y eventualmente contaminadas esto puede resultar mucho más complicado, como ya hemos mencionado anteriormente.

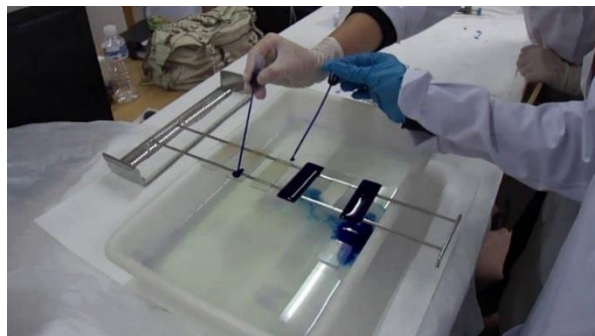
No obstante se debe efectuar el intento, macerando el soporte con la muestra sospechada en unas gotas de solución fisiológica durante varias horas y luego transfiriendo el líquido resultante a un portaobjetos de vidrio. Luego cubrimos con cubreobjetos y miramos al microscopio. Algunos autores ponen a centrifugar el macerado para decantar el material celular y luego de eliminar el sobrenadante transferir el semen al portaobjeto. Esta técnica está cuestionada por la posibilidad de alteración de la morfología celular por el efecto de centrifugación.

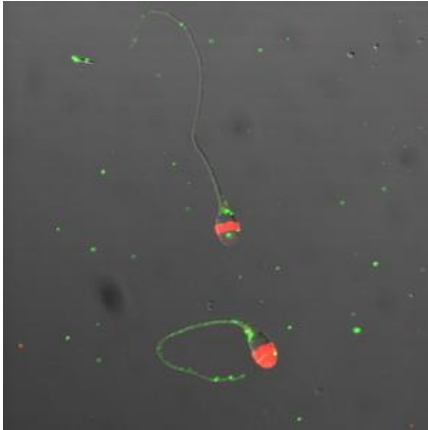
Observación microscópica previa coloración

Los preparados mencionados más arriba pueden colorearse, y de esta forma que sea más sencillo detectar los espermatozoides. El secado se hace a temperatura ambiente cuidando que el preparado no se contamine, luego se fija para lo cual es suficiente el rápido pasaje del portabojeto sobre la llama o de lo contrario sumergirlo en alcohol 70° durante 5 minutos. Para la coloración propiamente dicha, existen distintos colorantes:

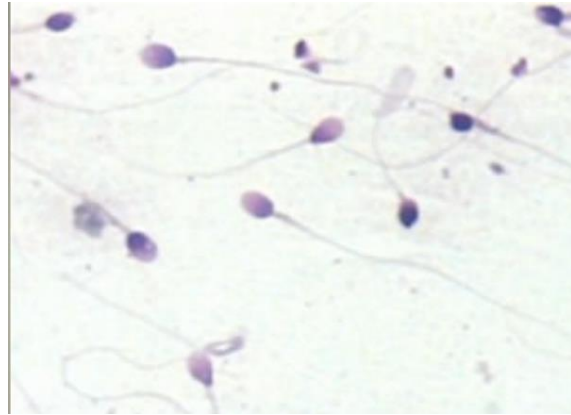
- La técnica de May Grunwald-Giemsa es la más común y además los colorantes se comercializan ya preparados en el mercado. Con esta coloración la cabeza del espermatozoide aparece con una coloración azul intensa en la parte más próxima al segmento intermedio, mientras que la parte anterior, el acrosoma de un color lila, el cuello y la cola de un gris oscuro, negro.
- Coloración Cristal Violeta: Luego de fijar con calor se tiñe durante 1 minuto con cristal violeta, se lava con agua corriente. Observamos el núcleo violeta intenso y el resto (acrosoma y cola) violeta más débil.
- “Tinción de Árbol de Navidad” se realiza 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.

Estas características tintoriales permiten facilitar la diferenciación de filamentos, esporas y partículas inespecíficas.





Tinción árbol de navidad



Tinción May Grunwald- Giemsa

ACTIVIDADES:

- 1) Lea atentamente el material aportado por las docentes y junto con lo estudiado en la Guía N°10, complete el siguiente cuadro comparativo.

GLANDULA	SUSTANCIA QUE SECRETA	FUNCION	ENSAYOS PARA SU IDENTIFICACION EN EL LABORATORIO
TESTICULOS			
PROSTATA			
VESICULAS SEMINALES			
GLANDULAS DE COWPER			