



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Métodos inmunológicos y de tinciones para la identificación de espermatozoides
en muestras de delitos sexuales

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciado en Laboratorio
Clínico e Histopatológico**

Autor:

Tarco Chinlle, Daysi Geovanna

Tutor:

Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez

Riobamba, Ecuador. 2023

DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, **Tarco Chinle Daysi Geovanna**, con cédula de ciudadanía **060607688-3**, autora del trabajo de investigación titulado: “**Métodos inmunológicos y de tinciones para la identificación de espermatozoides en muestras de delitos sexuales**”, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autora de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 28 de abril de 2023.



Daysi Geovanna Tarco Chinle

C.C: 060607688-3

DICTAMEN FAVORABLE DEL TUTOR Y MIEMBROS DE TRIBUNAL;

Quienes suscribimos, catedráticos designados Tutor y Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación Métodos inmunológicos y de tinciones para la identificación de espermatozoides en muestras de delitos sexuales, presentado por Daysi Geovanna Tarco Chinlle, con cédula de ciudadanía número 060607688-3, certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha asesorado durante el desarrollo, revisado y evaluado el trabajo de investigación escrito y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 28 de abril de 2023.

Mgs. Yisela Carolina Ramos Campi
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO

Mgs. Aida Mercedes Balladares Saltos
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez
TUTOR

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación Métodos inmunológicos y de tinciones para la identificación de espermatozoides en muestras de delitos sexuales, presentado por Daysi Geovanna Tarco Chinlle, con cédula de ciudadanía número 060607688-3, bajo la tutoría de Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 28 de abril de 2023.

Mgs. Yisela Carolina Ramos Campi
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



Mgs. Aida Mercedes Balladares Saltos
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez
TUTOR



CERTIFICADO ANTIPLAGIO



Dirección
Académica
VICERRECTORADO ACADÉMICO



CERTIFICACIÓN

Que, **TARCO CHINLE DAYSI GEOVANNA** con CC: **060607688-3**, estudiante de la Carrera **LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO, NO VIGENTE**, Facultad de **CIENCIAS DE LA SALUD**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**Métodos inmunológicos y de tinciones para la identificación de espermatozoides en muestras de delitos sexuales**", cumple con el 6 %, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **URKUND**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 25 de abril de 2023

Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez
TUTOR TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han ayudado a cumplir cada una de mis metas trazadas.

A mi hija quien ha sido el motivo para salir adelante y cumplir con todos mis objetivos propuestos. A mis hermanas que en todo momento han estado conmigo, demostrándome su cariño y apoyo incondicional.

Tarco Chinlle Daysi Geovanna

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia porque con su constante apoyo y confianza, han hecho de mí una mujer fuerte ante muchas adversidades. Me permito agradecer en primer lugar a todas las autoridades que conforman la Universidad Nacional de Chimborazo, por abrirme las puertas permitiéndome una buena formación profesional. De igual manera agradezco a todos los profesores que me han acompañado durante mi formación académica, a mi tutor, Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez, quién con sus enseñanzas y valiosos conocimientos facilitaron la realización del presente trabajo; gracias por su paciencia y dedicación. Por último, me permito agradecer el apoyo para con este trabajo a todas mis amigas, por brindarme su solidaridad y amistad permanente.

Tarco Chinlle Daysi Geovanna

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	14
INTRODUCCIÓN.....	14
CAPÍTULO II.....	19
MARCO TEÓRICO.....	19
ESPERMATOGÉNESIS.....	19
Fases de la espermatogénesis	19
SEMEN.....	20
Formación del semen	20
Composición del semen	21
ESPERMATOZOIDES.....	21
Generalidades	21
DELITOS SEXUALES.....	22
Indicios biológicos en delitos sexuales	23
Recolección de semen.....	23
Control de Calidad.....	24
CADENA DE CUSTODIA.....	24
MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	24
Prueba de Seminogelina Humana (RSID – Semen).....	25
Fosfatasa Ácida Prostática (FAP).....	25
Antígeno Específico de Próstata (PSA)	26
TINCIONES.....	26
Christmas Tree.....	26
Eosina.....	27
CAPÍTULO III	29
METODOLOGÍA.....	29
Tipo de investigación.....	29
Técnica de recolección de datos	29
Población.....	30
Muestra.....	30
Métodos de estudio	30
Procesamiento estadístico	31

Consideraciones éticas	31
Procesamiento de Datos	32
CAPÍTULO IV	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos inmunológicos y marcadores bioquímicos para la determinación de espermatozoides

Tabla 2. Protocolos y condiciones para la toma de muestra en la determinación de espermatozoides en delitos sexuales

Tabla 3. Presencia de espermatozoides en las diferentes tinciones utilizadas en muestras de delitos sexuales

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Flujograma del proceso para peritajes forenses en delitos sexuales

RESUMEN

Los delitos sexuales son considerados un problema global, en Latinoamérica es un conflicto no solo de salud pública sino también de violación hacia los derechos humanos y en el Ecuador de acuerdo con la Fiscalía General del Estado son más frecuentes las denuncias por abuso sexual cometidos generalmente por familiares o personas cercanas a la víctima. El presente trabajo de investigación obedeció al objetivo de especificar los métodos inmunológicos y de tinciones de espermatozoides en muestras de delitos sexuales, con una metodología de tipo descriptiva con un diseño documental no experimental de cronología tipo retrospectivo, con una población de 67 artículos científicos y 24 como muestra, escogidos plataformas digitales como Scielo, Pub Med, Elsevier, Medigraphic y Google Académico. Los resultados obtenidos fueron que, de las pruebas orientativas, la P-30 es utilizada en un 61,09 %, la FAP en un 29,76%, y la Seminogelina en un 9,13%, todos estos con una excelente sensibilidad y especificidad, gracias al principio de la interacción antígeno-anticuerpo, mientras que las pruebas confirmatorias como la microscopía resultó que, la tinción de Christmas tree se usa con más frecuencia en un 51,83%, y que, los protocolos permite salvaguardar los indicios durante su recogida, conservación, y envío, garantizando calidad en los resultados. En conclusión, los métodos inmunológicos y tinciones aportan resultados de valor en una investigación de delitos sexuales, siendo el semen el indicio biológico principal dentro del cometimiento los hechos.

Palabras claves: delitos sexuales, métodos inmunológicos, tinciones, indicios, evidencias

ABSTRACT

Sexual crimes are considered a global problem. In Latin America, it is a conflict not only of public health but also a violation of human rights, and in Ecuador, according to the Attorney General's Office, complaints of sexual abuse are more frequent, generally committed by family members or people close to the victim. The present research work obeyed the objective of specifying the immunological and sperm staining methods in samples of sexual crimes, with a descriptive methodology with a non-experimental documentary design of retrospective chronology, with a population of 67 scientific articles and 24 as a sample, chosen from digital platforms such as Scielo, Pub Med, Elsevier, Medigraphic, and Google Scholar. The results obtained were that, of the orientation tests, P-30 is used in 61.09%, FAP in 29.76%, and Seminogelin in 9.13%, all with excellent sensitivity and specificity, thanks to the principle of antigen-antibody interaction. In contrast, confirmatory tests such as microscopy showed that Christmas tree staining is used more frequently at 51.83% and that the protocols allow for safeguarding the specimens during their collection, preservation, and shipment, guaranteeing quality results. In conclusion, immunological methods and stains provide valuable results in investigating sexual crimes, with semen being the main biological evidence in the commission of the crime.

Keywords: sexual offenses, immunological methods, staining, clues, evidence.



firmado electrónicamente por:
**DARIO JAVIER
CUTIOPALA LEON**

Reviewed by:
Lic. Dario Javier Cutiopala Leon
ENGLISH PROFESSOR
c.c. 0604581066

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los delitos sexuales son una realidad presente el mundo entero, considerados como actos que atentan contra la libertad sexual sin que la víctima haya dado su consentimiento, sin embargo, cada país maneja sus propias definiciones, y alguno de ellos cambian su denominación, realizando reformas dentro de sus leyes, pese a esto la finalidad termina siendo la misma, proteger y garantizar la integridad de la víctima.

El Código Integral Penal (COIP) establece que el abuso sexual, es todo acto que se ejecuta sobre una persona en contra de su voluntad sin penetración o acceso carnal, mientras que en la violación existe la introducción total o parcial del miembro viril, además de otros órganos u objetos por vías vaginal, anal, y oral. Estas formas de agresiones son consideradas como delitos en contra de la integridad sexual y reproductiva de una persona, que serán sancionadas con diferentes penas de acuerdo a la gravedad del hecho¹.

La Agencia Nacional de Policía de Japón, en el 2018, detalló que, existieron alrededor de 1307 denuncias por violación, y 5340 casos de delitos sexuales. Entre el 2019 y 2020 se registró un aumento del 15,5% de casos, en donde, en el mes de agosto, hubo alrededor de 4 456. Centros de apoyo a personas afectadas por agresiones sexuales expresaron que recibieron un total de 23050 solicitudes de ayuda, mediante diferentes medios, como llamadas telefónicas².

En este año el Equipo de Vigilancia de los Derechos Humanos de Alto Comisionado de las Naciones Unidas, informó que, en Ucrania, han recibido 124 presuntos actos de violencia sexual hasta el mes de junio, donde la mayoría de víctimas son mujeres con una cifra de 56 denuncias, mientras que, 49 pertenecen a menores y 19 a hombres. Todos estos actos están relacionados con el conflicto entre Ucrania y Rusia³.

De acuerdo con un informe entregado por parte del Ministerio del Interior de España en el año 2021 se evidenció un total de 7898 delitos sexuales, donde comunidades como Cataluña, Andalucía y Madrid acumularon la mitad de las denuncias por agresiones sexuales, mientras

que, en el primer trimestre del año 2022, se elevó a 4191 casos, teniendo un crecimiento del 21,6% más que el año anterior. Además, se indica también, que en un 97% los responsables de atentar contra la integridad sexual son los hombres, siendo el sexo femenino el grupo más vulnerable^{4,5}.

Según un informe emitido por la Coalición Nacional contra la Violencia Doméstica (NCADV) en Estados Unidos, en la sede de Colorado, alrededor de una de cada cinco mujeres han sufrido abuso sexual, donde los responsables del 46,7% de estos casos son conocidos y familiares, y del 45.4% son por exparejas. De acuerdo con la Red Nacional de Violación, Abuso e Incesto, informa que existe un promedio de 433600 casos de violación sexual al año en Estados Unidos, el 54% de las mujeres que son abusadas sexualmente tienen la edad entre 18 y 34 años, mientras que el 15% corresponde a menores entre los 12 y 17 años^{6,7}.

Alumbra es una comunidad integrada por organizaciones de la sociedad civil y agencias nacionales, que proyecta a la violencia sexual como un fenómeno persistente y latente, esta organización dio a conocer un reporte de la ciudad de México, que indica que en el año 2019 se registró un total de 53429 casos, en el 2020 la cifra aumentó a 54314 casos a nivel nacional, con un 41% de casos por abuso sexual y el 23% por violación simple y en el 2021 se evidencia que el aumento de cifras en ese año fue del 87%, constituyendo un aumento de delitos sexuales a nivel nacional⁸.

En Argentina, se considera como violación al delito de abuso sexual con acceso carnal, y, según datos del Ministerio de Seguridad de la Nación, indica que existe un incremento en el 2020, con un registro de 5613 violaciones, de los cuales el 80% de todos estos casos corresponde a víctimas femeninas y el porcentaje de hombre afectados es del 10%, además en este país alrededor de 79 ataques sexuales son denunciados cada día^{9,10}.

En Brasil el panorama es aún más grave, en el año 2021, los casos de violaciones aumento en un 3,7%, con 56098 casos, lo que representa un abuso cada diez minutos, pero, los más afectados son niñas y niños menores de 14 años, donde en una población de 66000 personas que han

sufrido de violencia sexual en ese país, el 61.3% corresponde a delitos de tipo sexual en niños y niñas^{11, 12}.

En Colombia las cifras entregadas por el Instituto de Medicina Legal acerca de los exámenes médicos legales, realizadas a las víctimas por abuso sexual del año 2021, indican que se practicaron un total de 22627 análisis. En el año de 2021 se presenció un incremento en casos de agresión sexual, un total de 2589 casos se presentó en el grupo de 18 a 28 años, 296 casos más que el 2019, en departamentos como Antioquia, Valle del Cauca, Bogotá, Medellín, Cali, Barranquilla y Cartagena de Indias, son los lugares donde se han presentado más casos de delitos sexuales¹³.

La Policial de Investigaciones en Chile informó que, en el año 2021, el país registró un total de 1 686 casos de delitos sexuales entre víctima y denunciante, siendo el abuso sexual en contra de niños y niñas el más frecuente, con un total de 691 casos, con un predominio en víctimas en el rango de 0-13 años, y de acuerdo al género el 85% corresponde a mujeres¹⁴.

En el Ecuador en el año 2020, según datos presentados por la Fiscalía General del Ecuador, se evidenció un gran crecimiento de denuncias por violación, llegando a presentarse hasta 142 denuncias semanales, donde el 85% de estas denuncias se encuentran dentro de la fase de investigación previa. Además, alrededor del 65% de los casos de abuso sexual son cometidos por familiares y personas cercanas a la víctima¹⁵.

En cuanto a la problemática de la pandemia, en el año 2020, hasta el mes de junio se tuvo un registro de 31087 llamadas de auxilio, donde el 55% correspondieron a Quito y Guayaquil. La defensoría del pueblo en el período de enero a octubre del 2020 asistió un total de 17336 casos de violencia de género, donde los casos de delitos sexuales ocuparon la cifra más alta, con 884 casos de violación, 856 de abuso sexuales y 72 por acoso sexual, pero de acuerdo con esta institución, estas cifras no evidenciaron la realidad de las mujeres en su totalidad, puesto que debido a la pandemia muchas de ellas se vieron obligadas a guardar silencio por encontrarse bajo el mismo techo que su agresor, impidiendo que puedan denunciar y acceder a la justicia¹⁶.

¹⁷.

En la provincia de Chimborazo la Fiscalía General del Ecuador menciona que de acuerdo con el Informe de Rendición de Cuentas entregado el año 2020, alega que se atendió alrededor del 37,79% de casos de delitos contra la integridad sexual, mientras que en el año 2021 la institución informa que como resultados se obtuvieron que, se consumaron un total de 194 casos de violación y 100 de abuso sexual^{18, 19}.

Los delitos sexuales son una realidad en nuestro entorno, que lamentablemente, cada vez parecen ser más frecuentes. Es así que cuando existe indicios de la perpetración de un delito sexual, con el objetivo de confirmarlo se debe cumplir con un protocolo, que incluye pasos como el interrogatorio, la valoración médico legal, examinación de la vestimenta, examen físico, análisis de laboratorio, entre otros.

Existen numerosos factores que afectan el éxito de las investigaciones forenses, incluyendo el tipo de evidencia que se analiza, la cantidad y la calidad de la muestra, así como las capacidades analíticas del laboratorio. El valor probatorio de la evidencia física depende de las circunstancias del caso, así como un elemento de prueba puede ser fundamental para el enjuiciamiento de un caso, también puede resultar insignificante en otro²⁰.

En el artículo 465 del COIP se establece que en los casos de delitos contra la integridad sexual y reproductiva, trata de personas e infracciones de violencia contra la mujer o miembros del núcleo familiar, cuando una persona ponga en conocimiento que ha sido víctima de una de tales infracciones penales y exista peligro de destrucción de huellas o rastros de cualquier naturaleza en su persona, los centros de salud públicos o privados acreditados a los que se acuda, deberán practicar, previo consentimiento escrito de la víctima o de su representante, los reconocimientos, exámenes médicos y pruebas biológicas correspondientes¹.

Para la identificación de la presencia de un determinado componente biológico en una muestra humana, el uso de herramientas apropiadas es un elemento fundamental dentro de la investigación, ya que permite a los investigadores forenses tomar decisiones y utilizar métodos presuntivos o confirmatorios para recuperar y enviar evidencia a laboratorios especializados,

además el procedimiento y el nombre del examen varia ligeramente según el tipo de líquido corporal a examinar y el estado de la muestra^{21, 22}.

La utilización de pruebas físicas en los delitos de violación y otras formas de violencia sexual se ha centrado tradicionalmente en las pruebas dejadas sobre o en la víctima, que demuestran que tuvo lugar la relación sexual, además de indicar que el responsable de dejar las evidencias fue el acusado. A raíz de esto se plantea el siguiente problema de investigación: ¿Es de utilidad la investigación de los métodos inmunológicos y de tinciones para la identificación de espermatozoides en muestras de delitos sexuales?

En este contexto en el presente trabajo se encontrará los diversos métodos inmunológicos que se usan como herramientas necesarias para poder demostrar el cometimiento de un delito sexual, donde el semen es el indicio más importante, aunque existen casos en los que no se encuentran hallazgos del mismo, pero esto no descarta la ausencia de este líquido biológico, demostrando la importancia del análisis del laboratorio clínico.

Los datos de esta investigación buscan dar un aporte al componente teórico gracias a nuevos resultados de estudios realizados, mediante los cuales se podrá demostrar el papel que cumplen los distintos métodos inmunológicos y tinciones utilizadas en el laboratorio clínico que se encuentran dentro de la investigación forense, para probar la vinculación de los perpetradores con sus víctimas en casos de delitos sexuales.

El objetivo general de la presente investigación bibliográfica es especificar los métodos inmunológicos y de tinciones de espermatozoides en muestras de delitos sexuales, basándose en tres puntos de vista:

1. Destacar los diferentes métodos inmunológicos y marcadores bioquímicos para la determinación de espermatozoides.
2. Investigar los protocolos y condiciones para la toma de la muestra en la determinación de espermatozoides en delitos sexuales.
3. Distinguir la presencia de espermatozoides en las diferentes tinciones utilizadas en muestras de delitos sexuales con ayuda de publicaciones científicas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso altamente complejo que se encarga de la producción, crecimiento, maduración y liberación del empaquetamiento del ADN de las células germinales masculinas conocidas como espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides, teniendo como objetivo principal el suministro continuo de espermatozoides. Este proceso se da en los túbulos seminíferos que se encuentran localizados en los testículos, iniciando en la etapa de la pubertad²³.

En el proceso de la espermatogénesis participan células como las de Sertoli, mioides peritubulares, células de Leydig además de células somáticas que se encuentran dentro de los testículos, permitiendo que se cumpla una serie de pasos, responsables de la producción de los espermatozoides. Para llevarse a cabo el proceso de la diferenciación de las espermatogonias a espermatozoides se necesita la asistencia de factores como las hormonas, genes, factores paracrinos y reguladores epigenéticos²⁴ (Anexo 1).

Fases de la espermatogénesis

El proceso de la espermatogénesis se lleva a cabo mediante 3 fases:

- 1. Fase proliferativa:** las espermatogonias pasan por una serie de divisiones mitóticas y a su vez se diferencian en espermatocitos primarios²³.
- 2. Fase meiótica:** en esta fase se lleva a cabo el proceso de la meiosis y la recombinación genética, obteniendo como resultado la formación de espermátidas haploides²³.
- 3. Fase de la espermiogénesis:** se origina la reparación de la estructura del citoesqueleto, dando lugar a las células germinales especializadas conocidas como espermatozoides²³.

SEMEN

El semen es un líquido biológico de aspecto lechoso, posee un color amarillo ligero, con un volumen promedio de 3,5 ml por eyaculado, su composición es de un 10% de espermatozoides, un 90% de plasma seminal, además el semen tiene la capacidad de producir fluorescencia. En la eyaculación existen varias fracciones²⁵ (Anexo 2):

1. Fracción preeyaculatoria

En esta fracción el semen es de consistencia mucosa, transparente y se caracteriza por no contener espermatozoides, su procedencia es desde las glándulas de Cowper y Litre, y su función es lubricar el canal de la uretra²⁵.

2. Fracción previa

Esta fracción tiene las características de ser fluida y tampoco existe la presencia de espermatozoides, su pH es ácido y posee una elevada concentración de fosfatasa ácida, antígeno prostático específico y ácido nítrico, todos estos elementos provienen desde la próstata²⁵.

3. Fracción principal

Los elementos presentes en esta fracción provienen del epidídimo y de los conductos deferentes, en esta fracción ya existe la presencia de espermatozoides²⁵.

4. Fracción terminal

Esta fracción es rica en semenogelina, es de consistencia gelatinosa y su lugar de procedencia es desde las vesículas seminales, el pH es alcalino, además contiene fructosa. Una característica importante de esta fracción es que los espermatozoides en su mayoría son inmóviles²⁵.

Formación del semen

La formación del semen empieza en los testículos, en donde se encuentran los túbulos seminíferos, lugar en donde se producirán los espermatozoides, para luego llegar al epidídimo llevando a cabo allí su maduración y almacenamiento. Para la formación del semen el proceso empieza cuando en el pene se acumula sangre y empieza la eyaculación²⁶.

En el proceso conocido como eyaculación se hacen presentes los espermatozoides maduros, mientras se desplazan desde el epidídimo mediante el vaso deferente, gracias a las contracciones del músculo liso, luego de esto el esperma llega a la ampolla, y aquí se agregan secreciones que contiene la vesícula seminal, convirtiéndose en fluido seminal que es llevado hacia la uretra gracias a la colaboración de los conductos eyaculatorios, pasando primero por la próstata en donde se agrega un fluido lechoso, el cual permite la formación del semen, para finalmente ser eyaculado en el extremo final de la uretra²⁶.

Composición del semen

En una eyaculación masculina se obtiene el 10% de espermatozoides y el 90% es líquido seminal. La densidad de los espermatozoides varía entre 50 a 150 millones por mililitro, por lo que cada eyaculación contiene entre 200 y 400 millones de ellos²⁷ (Anexo 3).

ESPERMATOZOIDES

Generalidades

Los espermatozoides son células móviles, con forma ovoide, con una longitud de 60 μm , y de 2,5 a 3,5 μm de ancho formados en las paredes de los túbulos seminíferos dentro de los testículos, los cuales producen alrededor de 120 millones espermatozoides/día. Son células que además poseen características específicas que le permiten tener una movilidad independiente, todo esto gracias a un proceso de diferenciación celular conocido como espermatogénesis^{28, 29,30} (Anexo 4).

Maduración bioquímica de los espermatozoides

Las células de Sertoli y el epitelio del epidídimo son parte fundamental dentro de la maduración de los espermatozoides, debido a que liberan un líquido especial rico en testosterona y estrógenos, enzimas y nutrientes conocido como eyaculado, acompañado de espermatozoides. Los túbulos seminíferos poseen fructuosa, ácido cítrico, fibrinógeno y prostaglandinas, los espermatozoides atraviesan estas estructuras para llegar a la vesícula seminal, y mediante el conducto eyaculador logran llegar a la próstata²⁸.

El líquido que se encuentra dentro de la próstata es alcalino, poco denso, lechoso y contiene ion calcio, fosfato, citrato, enzima de coagulación y pro-fibronolisina, además en su composición se encuentra una proteína coagulante que permite que el fibrinógeno se active y forme un coágulo dentro de la vagina de mujer provocando que el semen se mantenga en las regiones más profundas²⁸.

Estructura del espermatozoide

Los espermatozoides están formados por la zona de la cabeza, la cual cumple con la función de contener al núcleo y al acrosoma, y por el flagelo, que está a cargo de la movilidad de esta célula. La cabeza posee el núcleo y este a su vez contiene el material genético, por su parte, el acrosoma del espermatozoide permite que se produzca la penetración en el óvulo, mientras que el flagelo o cola realiza movimiento en forma de látigo para lograr que el espermatozoide se impulse³⁰.

DELITOS SEXUALES

En el Ecuador los delitos sexuales se conceptualizan en el COIP (Código Orgánico Integral Penal) como delitos contra la libertad sexual, en donde se prioriza la protección de las víctimas a través del reconocimiento de sus derechos con la finalidad de frenar delitos como el abuso sexual y la violación, ya que a medida que pasa el tiempo los casos incrementan a nivel nacional e internacional³¹.

De acuerdo al COIP los delitos contra la libertad sexual se encuentran establecidos de la siguiente manera:

Artículo 170: La persona que, en contra de la voluntad de otra, ejecute sobre ella o la obligue a ejecutar sobre sí misma u otra persona, un acto de naturaleza sexual, sin que exista penetración o acceso carnal, será sancionada con pena privativa de libertad de tres a cinco años¹.

Artículo 171: Es violación el acceso carnal, con introducción total o parcial del miembro viril, por vía oral, anal o vaginal; o la introducción, por vía vaginal o anal, de objetos, dedos u órganos distintos al miembro viril, a una persona de cualquier sexo¹.

Los delitos sexuales comúnmente se evidencian dentro del contexto familiar, particularmente en las denuncias realizadas, los victimarios resultan ser personas cercanas a la víctima, como

padres, tíos, hermanos, etc., y en la mayoría de los casos se produce haciendo uso de la fuerza, por esta razón en Ecuador se han emitido leyes que garanticen la protección a los sectores más vulnerables³¹.

Indicios biológicos en delitos sexuales

Los indicios o muestras biológicas que se reciben a menudo en los laboratorios forenses con fines investigativos son sangre, semen, saliva, restos orgánicos, pelo, tejidos, uñas, restos óseos y dientes.

- **Muestra de Semen:** para el caso de delitos sexuales la muestra de elección es el semen, que resulta ser uno de los indicios fundamentales, su búsqueda en la víctima y en el agresor son importantes, y dependiendo del tipo de agresión, serán tomadas las muestras, que pueden ser provenientes de lugares como el perineo, vagina, ano y boca de la víctima. Además, es necesario realizar la debida inspección de la ropa interior, entre otras prendas que sean posibles evidencias de que hubo la presencia de un delito sexual²⁵.

El semen se puede presentar de cuatro formas:

1. Como mancha
2. Impregnado en un tejido
3. Como fluido mezclado con otros fluidos corporales
4. Como semen líquido

Recolección de semen

Víctima: la toma se realizará con un hisopo estéril previamente mojada con agua destilada, limpiando toda el área y realizando movimientos suaves³².

Soportes sólidos: para retirar la muestra de un soporte sólido, por ejemplo, prendas de vestir, sabanas, toallas, etc, la recolección se realiza con un hisopo mojada en agua destilada, frotando en el lugar donde se encuentre el fluido biológico y luego se lo coloca en un microtubo, para su posterior análisis³² (Anexo 5).

Control de Calidad

Una parte fundamental dentro del control de calidad es la recogida y preservación de la muestra, con el objetivo de proteger las pruebas en la escena del crimen. Al momento de recoger la muestra, se usan métodos que permitan resguardar la muestra de factores que provoquen la pérdida y degradación de la evidencia, además se debe incluir la documentación correspondiente que forma parte del proceso para la recogida los de indicios³³.

Existen condiciones en las que la recogida o toma de muestra resultan ser complicados, debido a esto, es recomendable que se recojan el mayor número de pruebas dentro de la escena del crimen, además el personal a cargo debe tener una gran experiencia dentro del campo del laboratorio forense. El transporte y almacenamiento del indicio se debe realizar con las condiciones adecuadas para preservar la seguridad de la muestra, asegurando que las pruebas lleguen de manera íntegra al laboratorio para su posterior análisis³³.

CADENA DE CUSTODIA

La cadena de custodia es un documento en donde consta un conjunto de procedimientos que son aplicados a los indicios que están ligados a un delito, la cadena de custodia empieza en el lugar donde se encuentran las evidencias y termina con la orden de la autoridad competente con la única finalidad de preservar la integridad de las evidencias, evitando que se expongan a posibles alteraciones o destrucciones. El personal de medicina legal y ciencias forenses son los encargados de aplicar la cadena de custodia en la investigación de un delito¹ (Anexo 6,7).

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

La confirmación de presencia de semen en un delito sexual es de gran utilidad a la hora de corroborar los alegatos de la víctima, además de brindar la posibilidad de generar un perfil genético del presunto sospechoso mediante el análisis de ADN posterior. La microscopía es considerada una prueba confirmatoria para afirmar la existencia de espermatozoides humanos, pero pueden existir factores que afecten la visualización de los mismos como por ejemplo la presencia de células epiteliales o bacterianas³⁴.

Por esta razón en la actualidad se ha desarrollado métodos basados en anticuerpos monoclonales con una especificidad predefinida para antígenos definidos permitiendo mejorar

de manera significativa la capacidad de distinguir entre marcadores específicos de interés, contribuyendo a descubrir el origen de manchas biológicas desconocidas dentro de varios casos forenses³⁴.

Prueba de Seminogelina Humana (RSID – Semen)

La seminogelina es considerado un componente abundante dentro del plasma seminal y se define como una proteína que tiene origen en las vesículas seminales y está encargada de la coagulación que se da en la eyaculación conjuntamente con la fibronectina, y a pesar de que la seminogelina no era común usarla como marcador específico de semen, en los últimos años esta prueba se ha posicionado como una prueba confirmatoria convirtiéndose en un marcador forense de gran utilidad^{34, 35}.

La prueba conocida como RSID-Semen que tiene como marcador bioquímico la seminogelina, y está diseñada para ser realizada en una variedad de muestras como ropa, hisopos vaginales, etc. Se trata de una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral, dicho principio utiliza dos cuerpos monoclonales anti-seminogelina humana, teniendo como ventajas que cuenta con una mayor sensibilidad, especificidad y velocidad frente a otros ensayos, además de que los resultados se obtienen en 10 minutos³⁶ (Anexo 8).

Fosfatasa Ácida Prostática (FAP)

La fosfatasa ácida prostática (FAP) es un elemento fundamental dentro de la búsqueda del semen, es sintetizada por la glándula prostática y durante la eyaculación es producida por el semen, además proviene de las células epiteliales de la glándula prostática causando que sus niveles sean altos en el semen, permitiendo su identificación mediante reacciones cromáticas o su cuantificación por análisis enzimático ya que tiene gran importancia al momento de encontrar el origen de una mancha de semen^{37, 38}.

Dentro del ámbito forense la fosfatasa ácida prostática es considerada como un marcador importante en los casos de muestras azoospermicas y oligozoospermicas, debido a su actividad incrementada en el fluido seminal, permitiendo que esta prueba sea considerada como un factor importante en las investigaciones de delitos sexuales, además actúa como un indicador para

determinar el tiempo aproximado del coito. La FAP es catalogada como una prueba orientativa, en donde la fosfatasa ácida prostática es el marcador bioquímico principal, la misma que deberá ser confirmado posteriormente con la microscopía³⁹ (Anexo 9).

Antígeno Específico de Próstata (PSA)

El Antígeno Específico de Próstata (PSA), es considerado una glicoproteína que se produce gracias a las células que se encuentran en la glándula prostática, sin embargo, también es posible encontrarla en otras partes de cuerpo como por ejemplo en tejidos, o en el líquido amniótico, además clínicamente es utilizado para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata^{40,41}.

El mejor marcador bioquímico forense para las investigaciones sobre delitos sexuales es el líquido seminal, y el PSA es uno de los elementos del semen que permite su detección en cantidades mínimas en prendas e hisopados vaginales. La prueba del PSA también es conocida como P-30 y posee una gran especificidad y sensibilidad, además utiliza anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno prostático específico provocando que se obtenga un complejo antígeno-anticuerpo²⁷ (Anexo 10).

TINCIONES

Dentro del estudio del líquido seminal como indicio en un delito sexual encontramos el rastreo de espermatozoides que se realiza mediante tinciones, la técnica de Christmas Tree o también conocida como Árbol de Navidad es considerada la tinción estándar, ya que es específica dentro del área forense para identificar espermatozoides.

Christmas Tree

Esta tinción tiene la finalidad de colorear diferentes partes del espermatozoide, es así que la cabeza y el acrosoma se tornan de color rojo o rojo-purpura gracias al colorante rojo rápido nuclear, la cola y región media se tiñen de un color verde debido a la acción del colorante índigo carmín, además también es posible observar células epiteliales en forma de rombo con una tonalidad de color rosado/rojo^{42, 43} (Anexo 11).

Existe la posibilidad de que no se evidencien espermatozoides en la tinción, esto puede a consecuencia de factores como los siguientes: puede deberse a la falta de semen en la muestra o porque la muestra utilizada es proveniente de una persona que padece azoospermia, para este tipo de casos, pruebas como FAP o PSA son las más indicadas para verificar la presencia de semen⁴⁴.

Eosina

Conocida también como tinción de Williams Pollack, es una de las más utilizadas para realizar el espermatograma, específicamente para observar la vitalidad de los espermatozoides, permitiendo que gracias a esta tinción se pueda distinguir con claridad estructuras como la cola y la cabeza que se colorean de color rojo-rosado. Debido a este principio la tinción de eosina es utilizada en investigaciones a modo de comparación para demostrar una posible alternativa después de la tinción estándar⁴².

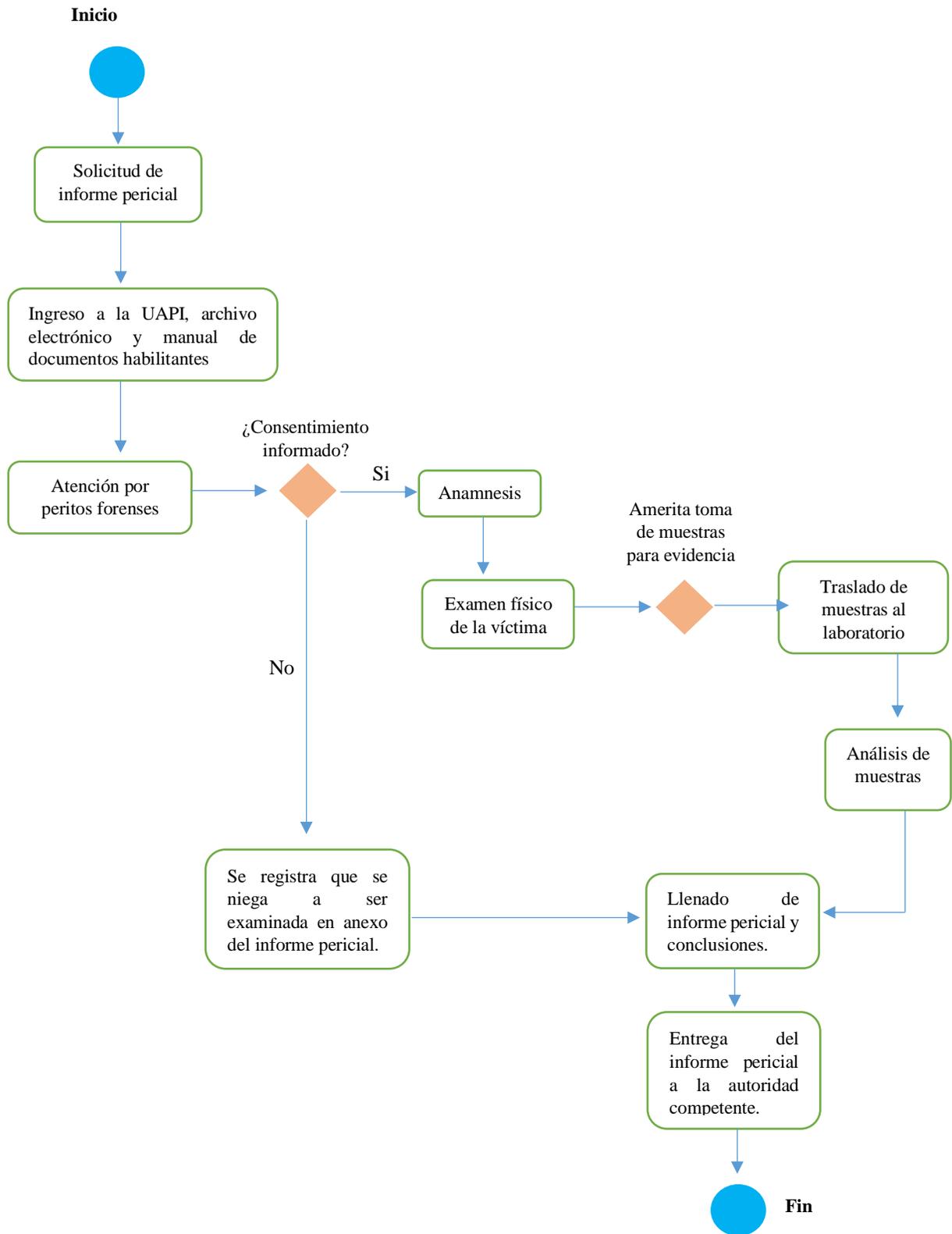


Ilustración 1. *Flujograma del proceso para peritajes forenses en delitos sexuales*

Fuente: (32)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Tipo de investigación

- **Nivel:** de tipo descriptivo, debido a que se analizaron las variables de estudio proporcionadas en donde se detalló información, sobre los diferentes métodos inmunológicos y tinciones necesarias para la identificación de espermatozoides, para luego mostrar los resultados obtenidos con aplicación de métodos estadísticos, para dar cumplimiento a los objetivos planteados.
- **Diseño:** esta investigación fue documental no experimental, porque la búsqueda de información manejada acerca del tema propuesto corresponde a estudios ya investigados, apoyándose en fuentes de investigación confiables de donde se obtuvo la información para la presente investigación.
- **Secuencia temporal:** correspondió a un trabajo de tipo transversal porque la investigación fue realizada durante un tiempo determinado, es decir que las fuentes bibliográficas analizadas pertenecen a estudios del año 2012 hasta el 2022.
- **Cronología de los hechos:** retrospectivo, porque la información recopilada para la investigación se tomó de documentos que contenían información ya estudiada sobre los métodos inmunológicos y tinciones utilizadas para la determinación de espermatozoides.

Técnica de recolección de datos

Las técnicas utilizadas para la recolección de datos en esta investigación fueron la búsqueda y análisis de información sobre los métodos inmunológicos y tinciones para la determinación de espermatozoides en muestras delitos sexuales en artículos científicos, tesis y paginas oficiales.

Población

La población de estudio para la elaboración de esta investigación estuvo conformada por un total 67 referencias bibliográficas obtenidas en revistas científicas, mediante palabras claves referentes al tema planteado, encontradas en distintas plataformas digitales que ofrecen información verídica y confiable, como Scielo, Pub Med, Elsevier, Medigraphic, Instituciones Públicas y Google Académico.

Muestra

Para la obtención de la muestra fueron seleccionados 24 artículos científicos, utilizando los criterios de inclusión y exclusión, cumpliendo con información precisa para su posterior organización, donde 10 corresponden a PubMed, 5 en Scielo, 4 en Elsevier, y 5 en Instituciones Públicas.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Artículos de revistas oficiales como: PubMed, Scielo, Google Académico, Elsevier, Medigraphic, Science Direct e Instituciones Públicas.
- Artículos en diferentes idiomas como español, inglés, chino, a causa de que varias investigaciones referentes al tema se encuentran en dichos idiomas.
- Artículos con información actualizada acerca de los distintos métodos utilizados para la identificación de espermatozoides en delitos sexuales.

Criterios de exclusión

- Artículos de hace más de diez años de publicación.
- Artículos que no aporten información sobre el tema investigado y que impidan el cumplimiento de objetivos propuestos.
- Documentos que no contengan todos los datos necesarios para generar la respecta bibliografía.

Métodos de estudio

En el presente trabajo se aplicó el método teórico, permitiendo analizar distintas fuentes bibliográficas relacionadas al tema de estudio, posibilitando encontrar información actualizada

en artículos científicos, publicaciones y libros acerca del tema planteado para su llevar a cabo su desarrollo.

Procesamiento estadístico

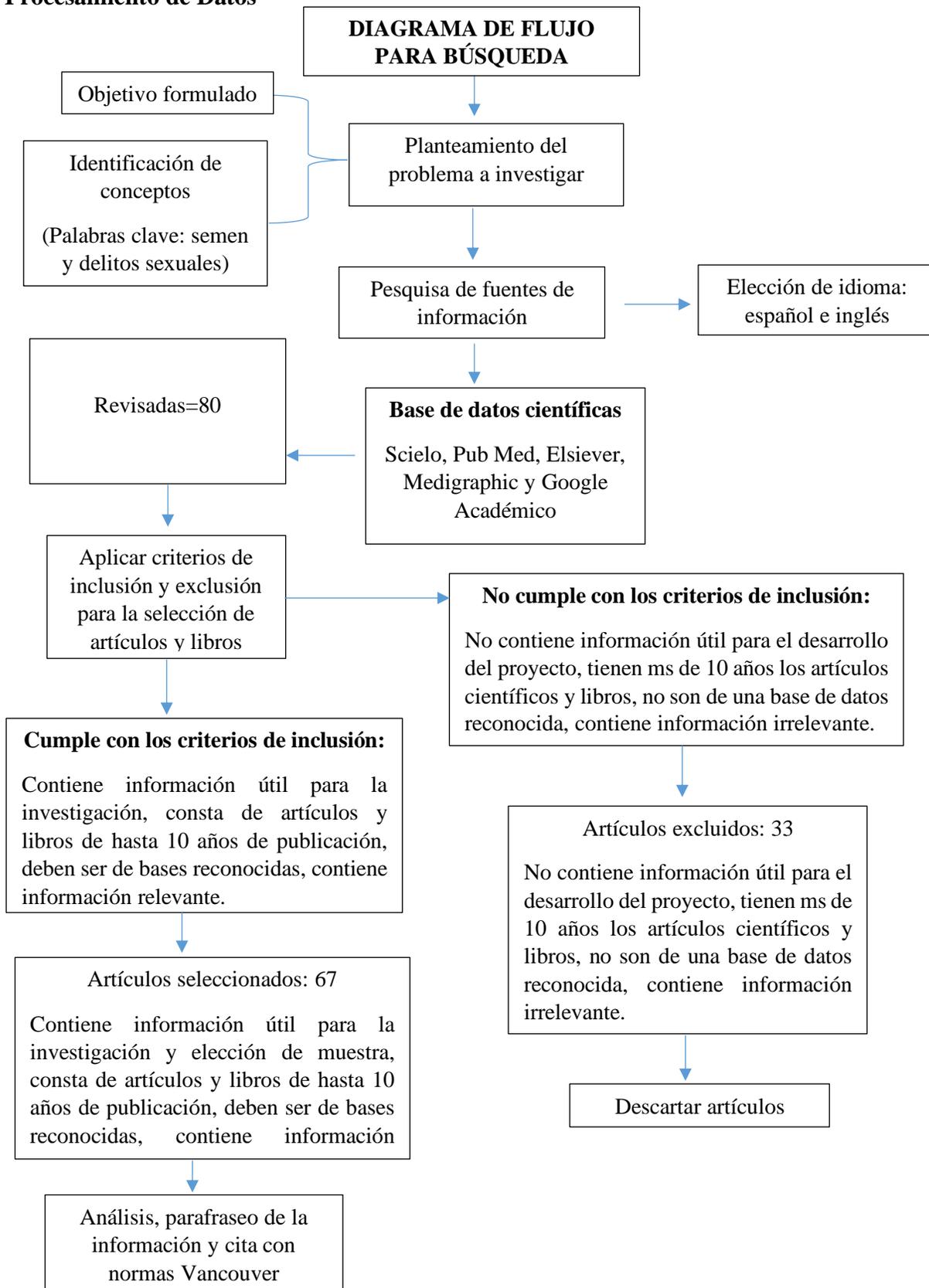
Para esta investigación se realizó un análisis de información y organización de los resultados obtenidos sobre los métodos inmunológicos, marcadores bioquímicos y tinciones utilizadas en muestras de delitos sexuales para la determinación de espermatozoides, los mismos que se encuentran expuestos en tablas.

Consideraciones éticas

Al tratarse de una investigación de tipo bibliográfico no existen conflictos bioéticos, ya que la muestra utilizada no fue de origen biológico y tampoco estuvo manipulada, por esta razón esta investigación respetó todas las consideraciones éticas necesarias que requiere una investigación científica.

|

Procesamiento de Datos



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se tomó en consideración para el análisis de resultados investigados diversos documentos con información oficial, los mismos que fueron organizados de acuerdo a los criterios de inclusión, se contó con 24 documentos que aportaron información necesaria para llevar a cabo los objetivos propuestos, tomando en cuenta que para la selección de documentos se lo hizo tomando en cuenta que no deben ser de más de 10 años de publicación.

El laboratorio forense juega un papel importante dentro de este ámbito, ya que ofrece pruebas orientativas y de confirmación que permite la detección de marcadores bioquímicos de índole seminal, como parte de indicios forenses que se encuentran involucrados dentro de los delitos sexuales. Pruebas como la FAP (fosfatasa ácida prostática), la proteína P-30 o también conocida como el antígeno prostático específico (PSA) y la seminogelina, ayudan en la investigación para establecer la existencia del delito.

Los resultados de los métodos inmunológicos y marcadores bioquímicos para la determinación de espermatozoides se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos inmunológicos y marcadores bioquímicos para la determinación de espermatozoides

MÉTODO INMUNOLÓGICO	MARCADOR BIOQUÍMICO	Nº MUESTRAS	TIPO DE MUESTRA	AUTORES	FRECUENCIA	%
ELISA	FAP	20	Tela Sintética (con semen)	Montenegro Villegas Fany Yakeliny	114	29,76
		39	Tela sintética (con semen)	Almaral Rodríguez Hiorley E.		
		50	Lienzo (con semen)	Bouvet B, Paparella C, Ombrella A, Pavesi A.		
		5	Hisopos vaginales (con semen)	Zagal Ramos Oswaldo		
			Semen	Rodríguez Jae Joseph Russell, C. Calacal Gayvelline, P. Laude Rita y A. De Ungria María Corazón		
Fibra de Algodón (con semen)	Nakanishi Hiroaki, Masaaki Harab, Shirushi Takahashib, Aya Takadab, Kazuyuki Saitoa					
Inmunocromatografía	P-30	191	Hisopos vaginales (con semen)	Valencia Pérez Sonia Estefanía	234	61,09
		5		Zagal Ramos Oswaldo		
		6	Tela (con semen)	Rozo Malaver María Fernanda		
			Látex (con semen)			
			Papel (con semen)			
		94	Hisopos vaginales (con semen)	Cisneros Valencia Jhomayra Michael, Villaroel Villaroel Carla		
		101		Villagómez María Dolores		
		10	Hisopos (con semen)	Quispe Mayta Sergio		
		13	Semen fresco	Boward Emily S, Wilson Stacey L.		
			Semen congelado			

			Semen + sangre			
			Semen +orina			
			Semen + saliva			
		5	Fibra de Algodón (con semen)	Nakanishi Hiroaki, Masaaki Harab, Shirushi Takahashib, Aya Takadab, Kazuyuki Saitoa		
Inmunocromatografía	Seminogelina	5	Semen	Rodríguez Jae Joseph Russell, C. Calacal Gayvelline, P. Laude Rita y A. De Ungria María Corazón	35	9,13
		9	Hisopos con semen	Old Jennifer, Brett A. Schweers, Pravat W. Boonlayangoor, Brian Fischer, Kevin W. P. Miller, and Karl Re		
		13	Semen fresco	Boward Emily S, Wilson Stacey L.		
			semen congelado			
			Semen + sangre			
			Semen +orina			
	Semen + saliva					
8	Fibra de Algodón (con semen)	Asmaa Abdel Rahman, Sarah A. Khater y Eman Abd El-Hakim Attia				

Análisis

En la tabla 1, se detalla los métodos inmunológicos y marcadores bioquímicos utilizados en estudios de los autores expuestos, predominando el análisis de muestras con la P-30 (61,09%). Al realizar la estadística correspondiente, se obtuvo que la FAP analizada en muestras por Elisa se usa en una frecuencia del 29,76%, y mediante el método de inmunocromatografía la P-30 con un 61,09% y la Seminogelina con un 9,13%.

Discusión

Los delitos de carácter sexual se han posicionado en uno de los más comunes alrededor del mundo, en Latinoamérica se registra niveles altos de estos delitos, debido a factores como el machismo, además de la carencia de educación, provocando que por estas condiciones las personas sean más susceptibles a cometer delitos contra la libertad sexual. En el Ecuador hay leyes que protegen a las víctimas, en especial a los niños y mujeres, debido a que es la población más afectada por los actos de delitos sexuales⁴⁵.

Existen estudios de diversos investigadores, que demuestran el rol que cumplen las diferentes pruebas forenses para comprobar la posible existencia de semen en evidencias forenses, Montenegro V. realizó un estudio en donde sometió a prueba a 20 muestras con semen (10 en tela sintética y 10 tela algodón), con reactivo fosfatasa ácida de uso clínico en una solución madre, solución 1/10, 1/100, 1/1000, obteniendo como resultados las 20 muestras positivas, comprobando que la fosfatasa ácida de uso clínico tiene la capacidad de detectar semen en soportes de tela de algodón y sintética, sin embargo no tiene la misma sensibilidad y especificidad que las pruebas que están diseñadas estrictamente para el uso forense³⁹.

Almaral R. en su investigación demostró mediante 39 muestras de semen en tela sintética que la FAP (Fosfatasa Ácida Prostática) presenta la propiedad de retener semen en este tipo de tela sintética, gracias a que todas las muestras resultaron positivas⁴⁶. Otro estudio similar es el Bouvet B, et al, pero en esta investigación se optó por utilizar 50 muestras de semen en lienzo, y fueron analizadas con un kit para la prueba FAP, dando como resultado todas las muestras positivas, evidenciando que el soporte de lienzo tiene la facultad de almacenar semen, si bien es cierto no concuerda con el mismo soporte de Almaral Rodríguez, se demuestra que la FAP es un arcador de gran importancia en diferentes soportes sólidos³⁸.

De acuerdo con Rozo M, luego de realizar un estudio en soportes de tela, látex y papel con semen, con un intervalo de tiempo del día 1 al día 30, demostró que con respecto al tiempo la proteína P30 es más estable y sensible en el látex⁴⁷. Aunque no existen estudios en el que se realicen análisis de los mismos soportes y pruebas forenses, tenemos información de otras investigaciones como la de Asmaa Abdel et al, que realizó un análisis de la seminogelina con 8 muestras de semen impregnadas en fibra de algodón con un intervalo de tiempo de 10 días, identificando todas la muestras analizadas como positivas gracias al kit RSID-Semen, logrando comprobar que es un método confiable pudiéndose detectar hasta 10 días de guardada la muestra⁴⁸.

Del mismo modo Hiroaki N et al, puso a prueba los métodos actuales utilizados en el ámbito forense en 5 muestras de fibra de algodón envejecidas de 56, 44, 41, y 33 años, y una actual, realizó el análisis con las pruebas de RSID-Semen (Seminogelina) y FAP (Fosfatasa Ácida Prostática), consiguiendo como resultados todas las muestras positivas, demostrando que los métodos que se usa en la actualidad tienen la facultad de aplicarse en manchas de semen de varios años. El autor menciona que esto es útil en casos forenses que necesitan volver a ser investigados, algunos de ellos de muchos años de antigüedad⁴⁹.

Otro estudio similar es el de Rodríguez Jae et al, que trabajó con un total de 5 muestras de semen postcoitales analizándolas con un kit para detección de seminogelina y de FAP (Fosfatasa Ácida Prostática), resultando todas las muestras como positivas, concluyendo que estos métodos resultan ser específicos y sensibles para semen, concordando con el autor Nakanishi Hiroaki y sus colaboradores al mencionar que estos métodos son ideales para detectar fluido seminal en cantidad mínimas ya que es específico convirtiéndose en un buen marcador forense^{49,50}.

Entre las evidencias forenses para la detección de semen están los hisopos vaginales, que son tomados de las víctimas, autores como Valencia S, demostró con su trabajo de investigación los resultados de 191 muestras de hisopos vaginales tomadas en distintos días (1-6 días), sometidas a análisis con un kit de P30, y como resultado se obtuvo un predominio de negativos en las muestras tomadas de distintos días, deduciendo que la razón de esto es a causa del tiempo en el que fueron tomadas las muestras, es decir que mientras más tiempo pase entre la agresión sexual y la toma de los hisopados, los resultados serán más negativos que positivos⁵¹.

Zagal R, analizó las pruebas de P30 y FAP (Fosfatasa Ácida Prostática), gracias a 5 muestras de hisopos vaginales en un intervalo de tiempo de 29 días, pero a diferencia del estudio de Valencia Pérez, aquí, las muestras que se usaron en el día 1, fueron las mismas que se analizaron hasta el día 29, entonces en cuanto a la FAP a partir del séptimo día ya no es detectable en dilución 1/100 y a partir del día 13 deja de ser detectable en una dilución 1/4, mientras que para el día 15 desaparece, pero para el día 29 la muestras son positivas solo en muestras sin diluir, mientras que la P-30 sigue siendo detectable, a pesar de la dilución usada⁵².

En la investigación de Cisneros V, se encuentra el análisis de 94 muestras de hisopos vaginales, con el fin de encontrar la presencia de la proteína P30, teniendo como resultados todas como positivas²⁷. Villagómez M, realizó el mismo estudio, pero con 101 muestras, y para el análisis de proteína P30, sin embargo, en esta investigación se obtuvieron 18 positivos y 31 negativos, guardando poca relación con el estudio anterior, y de acuerdo al autor esto se debería a posibles factores exteriores a la hora de tomar la muestra o durante el proceso del análisis de la muestra, además cabe destacar que la P30 es más sensible en prendas de vestir⁵³.

Mencionando a otros autores, Old Jennifer et al, quien realizó su investigación con 9 muestras de hisopos con semen para el análisis de seminogelina, para demostrar la validación del kit RSID_{Tm}-Semen, para esto se sometió a análisis 9 muestras de siete días de aislamiento, y las mismas muestras, pero con la diferencia de tener 14 días de ser guardadas, así se consiguieron 9 positivos en los dos tiempos que fueron analizados, siendo así que la seminogelina es más sensible para su detección³⁴.

Boward E et al, para su estudio trabajó con 13 muestras postvasectomía, divididas de la siguiente manera: 5 muestras de semen fresco, 5 de semen congelado, 1 de semen más sangre, 1 de semen más orina, y una de semen más saliva, todas ellas fueron sometidas para el análisis de seminogelina y P30, resultando que en ambas pruebas se obtuvieron positivos al 100%, evidenciando que cada una de ellas posee la capacidad de detectar semen, sin embargo la técnica para el análisis de P30 (ABAcad) resulto más flexible debido a su precio, además de que ofrece un proceso más simplificado³⁵.

Las manchas de semen llegan a ser estables en prendas e hisopados vaginales, haciendo posible su detección inmediata, incluso en mínimas cantidades, así lo demostró en su investigación Quispe M, con 10 muestras de hisopos impregnados con semen, las mismas que fueron estudiadas con el método inmunológico de la proteína P30, obteniendo resultados positivos en su totalidad, afirmando así que el PSA o P30 sirve como un excelente marcador forense dentro de una investigación de delitos sexuales⁵⁴.

La evaluación pericial constituye una metodología compleja y el papel de los profesionales de los laboratorios forenses es relevante desde la recogida de los distintos indicios forenses hasta su posterior análisis, y para asegurar la calidad de los resultados periciales, están los protocolos de actuación forense que contienen características particulares que sirven de guía para obtener, elementos, rastros e indicios en la escena del crimen, así como todo el procedimiento en el laboratorio forense⁵⁵.

En la Tabla 2 se observa los protocolos y condiciones para la toma de muestra en la determinación de espermatozoides en delitos sexuales.

Tabla 2. Protocolos y condiciones para la toma de muestra en la determinación de espermatozoides en delitos sexuales

INSTITUCIÓN O AUTOR DEL PROTOCOLO	PAÍS	PROTOCOLO				CONDICIONES	
Fiscalía General de Estado	Ecuador	Tipo de muestra	Recolección	Preparación	Embalaje	Hisopos	Otras muestras
		Bucales	Hisopos: lengua, contorno de encías, paladar	Numerar hisopos Secar a temperatura ambiente.	Cadena de frío, embalado sellado y etiquetado	Estériles: de algodón Siempre rotulados	Medidas de bioseguridad Prendas mojadas: primero dejarlas secar a temperatura ambiente. No sacudir la prenda.
		Superficie corporal	Hisopados de varias partes del cuerpo				
		Cervicales	Hisopos: cervical, vaginal y de genitales externos.				
		Anales	Hisopos: conducto recto-anal y margen anal				
		Vello púbico	Pelos dubitados	Colocar sobre papel	Papel doblado en una bolsa de papel pequeña.		
		Ropa de la víctima	Retirar la ropa	Envolverla en papel e introducir en bolsas independientes	Embalar, sellar y etiquetar.		
Fiscalía de la Nación- Ministerio Público	Perú	Introito vaginal	Hisopado de toda la zona	Secar a temperatura ambiente	Cajas, rotuladas y con cinta de seguridad		
		Vagina	Fondo de saco vaginal				
		Ampolla rectal	Hisopo húmedo en la zona, realizando círculos				

		Glande, cuerpo pene	De manera circular con 2 hisopos juntos	Secar a temperatura ambiente	Cajas, rotuladas y con cinta de seguridad		temperatura ambiente. No sacudir la prenda.	
		Escroto	Movimientos circulares					
		Bucal	Hisopos: mucosa					
		Vello púbico	Tomar los vellos con una pinza	-	Bolsas de papel independientes, rotulados y con cinta de seguridad.			
		Condón	Frotis con hisopos más agua estéril	Secar a temperatura ambiente	Cajas, rotuladas y con cinta de seguridad			
		Toalla higiénica	-		Bolsas de papel, cada elemento por separado, rotulado y con cinta de seguridad			
Ministerio de Justicia y Derechos Humanos	Argentina	Cavidad bucal (coito oral)	Hisopos: lengua, encías, dientes y paladar	Secar hisopos	Sobres de papel, identificados y número de hisopo	Estériles Secar a temperatura ambiente	Medidas de bioseguridad Guardar por separado Recolección con pinzas estériles Prendas húmedas: secarlas a temperatura ambiente	
		Genitales	Hisopos: zona cervical, vaginal, genitales externos y anales	Secar a temperatura ambiente				
		Superficie corporal	Hisopar manchas de semen	Mancha seca: embeber en solución fisiológica o agua destilada estéril Secar hisopos a temperatura ambiente				
		Vello púbico	Pelos dubitados sobre papel	Guardar por separado				Embalar en papel, rotulado y sellado
		Ropa de la víctima	Inspeccionar y retirar la ropa					Por separado, rotuladas y etiquetadas

Trejos Romanini Micxy	Costa Rica	Vaginales	Hisopos: toda el área	Secar hisopos a temperatura ambiente	Evidencias etiquetadas y correctamente selladas.	Muestra antes de las 72 horas del delito. La víctima no se ha bañado o aseado el área para tomar la muestra Cuando se sospeche de la presencia de material biológico.	
		Anales	Hisopos: toda el área				
		Cavidad oral	Hisopos: toda el área				
		Vulvares	Hisopos: toda el área				
		Piel	Hisopos: toda el área				
Consejo Médico Forense	España	Bucales	Hisopos: lengua, encías, dientes y paladar. Lavado bucal que será recogido en tubo.	Dejar secar los hisopos a temperatura ambiente	Cajas de cartón o tubo específicos para tubos, rotular y sellar correctamente.	Estériles Toma anal, evitar enviar heces.	Medidas de bioseguridad Enviar toda prenda que se considere de interés.
		Superficie corporal	Hisopar sobre el área donde se sospeche que hay mancha de semen.	Dejar secar los hisopos a temperatura ambiente.	Cajas de cartón o tubo específicos para tubos, rotular y sellar correctamente	Si se agrega agua destilada o suero fisiológico, evitar la	
		Anales y margen anal	Hisopos humedecidos: margen anal y conducto anorrectal.				
		Vello púbico y pelos dubitados	Peinar suavemente los vellos de la víctima	Colocar sobre papel	Embalar en papel, rotulado y sellado		

		Vaginales, cervicales, genitales externos	Hisopos humedecidos: región vulvar Hisopos secos: cavidad vaginal y cuello uterino.	Secar los hisopos a temperatura ambiente.	Cajas de cartón o tubo específicos para tubos, rotular y sellar correctamente	dilución de la muestra.	
		Lavado vaginal	Después de la toma de hisopos	Lavado: 10 ml de suero fisiológico y recoger en tubos			
		Ropa de la víctima	Retirar la ropa con cuidado	Colocar sobre papel las prendas por separado	Rotular y embalar correctamente		

Análisis

En la tabla 2 se encuentran protocolos y condiciones que se aplican en el momento de tomar la muestra de semen en casos de delitos sexuales, de diferentes países, evidenciando que en todos guardan cierta similitud. Es importante mencionar que la finalidad de estos documentos es velar por la integridad total de la víctima.

Discusión

El Consejo Médico Forense del Gobierno de España mediante su protocolo de actuación médico forense ante la violencia sexual tiene por objetivo mejorar la acción pericial, respetando la situación de la víctima con un adecuado proceso en la recogida, conservación, envío, e investigación, y considera que violencia sexual es aquella en donde hay la probabilidad de encontrar indicios que permitan el esclarecimiento de los hechos, además se menciona que el tiempo ideal para una eficiente detección de indicios es de 72 horas, no obstante gracias a los avances de la ciencia el tiempo se ha extendido hasta los 7-10 días, velando siempre la salud física y mental de la víctima⁵⁶.

Aun cuando existen protocolos específicos para el manejo de evidencia en un delito sexual, el Ministerio de Justicia y Derechos Humanos de Argentina⁵⁵ presenta un documento unificado acerca del levantamiento de indicios probatorios en el lugar de la escena del crimen en general, abarcando procedimientos en el caso de existir un delito sexual, pero no cuenta con un sistema detallado que ofrezca información acerca de la atención hacia la víctima, esto debido posiblemente a que en este país se maneja una definición distinta acerca de la violación, pese a que si existe un documento en el que se plantea la atención hacia víctimas de violaciones sexuales, este va dirigido al personal de salud hospitalario y no forense⁵⁷.

Por otro lado esta Costa Rica quien aún no cuenta con un protocolo formal para el manejo de delitos sexuales, expone una propuesta que faculta a los laboratorios forenses llevar a cabo procedimientos para el levantamiento y análisis de evidencia clave en el lugar de los hechos y especialmente en la víctima, haciendo énfasis en la importancia de la toma de muestras, considerado que esta propuesta señala un tiempo determinado en el que se debe realizar la toma de muestra dependiendo del área de donde sea recogida, pese a ello, el tiempo estándar es de 72 horas, guardando relación con el protocolo propuesto por el Consejo Médico Forense del Gobierno de España^{56,58}.

El instructivo elaborado por la Fiscalía Suprema del Ministerio Público de Perú, tiene por objetivo proveer de instrucciones a los profesionales encargados de la recolección, manejo y análisis de los diferentes elementos en una investigación de delito sexual, además de asegurar una evaluación pericial integral de víctima, en este documento se detalla minuciosamente como se lleva a cabo la revisión de la víctima, y en cuanto a los análisis que se necesitan como un medio auxiliar, en el caso de un examen espermatozoides hasta 72 horas después del acto, sin embargo en el protocolo de este país recomienda que la toma de muestras sea hasta las 24 horas después a la agresión sexual⁵⁹.

La Fiscalía General del Estado del Ecuador contiene un protocolo extenso en el cual se describen procedimientos para distintas áreas forenses, y, a diferencia de los otros protocolos nombrados de diferentes países, esta cuenta con protocolos de bioseguridad para los distintos laboratorios de ciencias forenses. En el capítulo I de dicho protocolo se encuentra específicamente la toma de muestras tanto en el lugar de los hechos, como en el imputado y la víctima, con respecto a los delitos contra la integridad sexual y reproductiva el documento menciona como se debe tomar los indicios de acuerdo al relato de la víctima, poniendo de por medio el respeto a la intimidad y confidencialidad, precautelando la dignidad, integridad física y psicológica, como lo menciona el COIP^{32, 1}.

En la presente investigación se expone protocolos de distintos países, constatando que existe similitud entre todos ellos, su objetivo en general es, primero, velar por el bienestar de la víctima, en todo aspecto, desarrollando de manera eficaz los procedimientos propuestos para su evaluación en el caso de delito sexual, seguido por las condiciones para la toma de muestra de evidencia que será parte fundamental a la hora de esclarecer un hecho, si bien es cierto, los protocolos mencionados son extensos, se ha tratado de resumir de manera que se exponga información clave sobre los diversos procesos que se debe realizar la toma de muestra de indicios y su posterior análisis.

Pese a que, se debería formular una discusión entre los diferentes protocolos expuestos, no se encontró discordia entre ellos, fueron mínimas las diferencias que se hallaron, pero irrelevantes dentro del proceso a seguir para la toma de muestras, y aun cuando algunos de estos documentos son más extensos que otros, todos ellos se resumen a tres puntos principales: la atención adecuada en cuanto a la salud física y mental de la víctima, la

evaluación pericial de la existencia de probables lesiones y lo más importante de esta investigación que es la apropiada adquisición de evidencias médico-legales además de la relación con los laboratorios forenses con el fin de aclarar una posible agresión sexual⁶⁰.

Otra prueba que determina si existió agresión sexual, y es considerada una prueba de confirmación importante es la microscopía, en la cual se puede observar la presencia de espermatozoides dentro de las evidencias recopiladas, la importancia de esta prueba radica en que al realizar el análisis de las evidencias con pruebas presuntivas se corre el riesgo de que la presencia de líquido seminal sea negativo debido a factores que alteren la prueba, pero al realizar la microscopía se puede confirmar la existencia del mismo mediante la presencia de espermatozoides.

En la Tabla 3 se expone la presencia de espermatozoides en las diferentes tinciones utilizadas en muestras de delitos sexuales.

Tabla 3. Presencia de espermatozoides en las diferentes tinciones utilizadas en muestras de delitos sexuales

AUTORES	N° MUESTRAS	SOPORTE (TELA)	TINCIÓN UTILIZADA	FRECUENCIA	%	RESULTADOS OBTENIDOS
Esquivias Ramírez Enrique	80	Algodón Sintética	Gram	110	22,36	Presencia de Espermatozoides
López Tamara Katty	30	Felpa Algodón Seda Sintética				
		30	Felpa			
	Algodón					
	Seda					
García Jiménez Marco	50	Ropa interior femenina	Christmas tree	255	51,83	
		Sabana				
		Ropa interior masculina				
		Licra				
Chávez Vera Luis Fernando	200	Semen				

Zagal Ramos Oswaldo	5	Semen				
Nakanishi H, Hara M, Takahashi S, Takada A	5	Semen	Baecchi	5	1,02	
Reina Bouvet B, Beatriz Pavesi A, Vicenta Paparella C	46	Oligozoospermicas (semen con levaduras)	Papanicolaou	46	9,35	
		Azoospermicas (semen con levaduras)				
	46	Oligozoospermicas (semen con levaduras)	Hematoxilina brillante	46	9,35	
		Azoospermicas (semen con levaduras)				Ausencia de Espermatozoides

Análisis

En la tabla 3 se expone las diferentes tinciones utilizadas para la identificación de espermatozoides en muestras de delitos sexuales. De acuerdo a la estadística la tinción más frecuente para analizar muestras es la de Christmas tree con 51.83%, seguida por la tinción Gram con un 22.36%, Papanicolaou y Hematoxilina brillante con un 9,35%, Cristal violeta con 6,10% y por último Baecchi con 1,02%.

Discusión

La tinción más utilizada para el rastreo de espermatozoides es conocida como tinción de Christmas tree o tinción Árbol de Navidad, la misma que permite teñir de manera específica las partes clave del espermatozoide, permitiendo observar estructuras como la cabeza, acrosoma y cola. Existen resultados en los que mediante la tinción no se pueden observar espermatozoides, pero existe positividad en otras pruebas realizadas, indicando que el individuo puede ser olizoozpermico⁶¹.

Sin embargo, investigadores han puesto a prueba a otras tinciones llevadas a cabo dentro del laboratorio forense, tratando de demostrar como objetivo principal que tienen la capacidad de permitir observar espermatozoides, tal vez no de manera específica como la tinción de Christmas tree o tinción Árbol de Navidad, pero si ofreciendo resultados confiables al momento de llevar a cabo el análisis de una muestra en casos de delitos sexuales, dando un aporte importante dentro del esclarecimiento de los hechos.

Además de la tinción Christmas tree, dentro del laboratorio forense, es posible el uso de otras tinciones, y es que estudios como el de Esquivias E, demostró mediante un estudio la presencia de espermatozoides gracias a la coloración Gram en dos tipos de soporte (algodón y sintético), manifestando que es posible el hallazgo de espermatozoides de 0 horas a 45 días, probando que la tinción Gram es útil porque permite distinguir la existencia de contaminantes dentro la lámina, concordando con López T, quien comprobó que es posible observar espermatozoides en diferentes tipos de soporte hasta dos meses después de ser tomada la muestra, con tinción Gram y Cristal violeta^{62,63}.

Pese a que, según López T, la tinción Gram ayuda a una mejor visualización y diferenciación, prefiere utilizar la tinción Cristal Violeta debido a su rapidez y bajo costo, además, los estudios de los autores tienen similitud, en comprobar que el soporte de algodón es el que más retiene espermatozoides conservando su forma o incompletos^{69,70}. Entre otras tinciones utilizadas están las de Papanicolaou y hematoxilina brillante, que gracias a Reina B et al, quien sometió 46 muestras divididas en dos grupos: 28 oligozoospermicas y 18 azoospermicas, con el extra de contaminarlas de levaduras de *Candida albicans*, encontrándose los siguientes hallazgos⁶⁴.

De acuerdo con la autora en el grupo de las muestras oligozoospermicas hubo predominio de presencia de espermatozoides en ambas tinciones, obteniendo solo cuatro placas sin espermatozoides, mientras que en el grupo de muestras azoospermicas en las dos tinciones aplicadas en ninguna placa se apreció espermatozoides. Debido a la existencia de levaduras, tuvo que recurrir a utilizar la tinción blanco de calcio fluor-azul de Evans y naranja de acridina, adicionalmente informando que esta metodología colabora al reconocimiento de levaduras, ya que son elementos frecuentes al momento de recoger evidencias forenses⁶⁴.

La tinción de Baecchi es poco conocida, a pesar de ello Hiroaki N et al, realizó su investigación con muestras envejecidas de hasta 56 años, además de una actual, en donde en todas las muestras se pudo apreciar la presencia de espermatozoides, llegando a la deducción que la tinción que presentaban las cabezas de los espermatozoides de las muestras envejecidas fueron similares a las muestras actuales, indicando que dicha tinción es capaz de aplicarse en muestras extremadamente envejecidas, contribuyendo a resolver casos antiguos de delitos sexuales que se han quedado sin resolverse⁴⁹.

La tinción Christmas tree es específica para la detección de espermatozoides e ideal para indicios de tipo soporte sólido, así lo comprobó García M, mediante su estudio, en donde puso a prueba diferentes tipos de soportes sólidos en donde frecuentemente se puede encontrar líquido seminal, demostrando que en su mayoría se encontraban espermatozoides, pero no se obtuvieron los mismos resultados con la prenda íntima tipo calzón, ya que no se apreció espermatozoides, debido a factores como el tipo de tela del calzón o su vez por algún tipo de factor externo durante el proceso de preparación de la tinción⁶⁵.

En el caso de la investigación de Chávez L, una de las cosas que es demuestra que la temperatura recomendable para conservar las muestras es la refrigeración, además coincide con García al explicar que las muestras al sujetarse a numerosos procesos de degradación, existe la posibilidad de que el número de espermatozoides disminuya, pero la sola presencia de un espermatozoide resulta ser suficiente, ya que la tinción tiene la capacidad de no teñir otro tipo de artefactos, solamente espermatozoides, resultando ser muy efectiva dentro los análisis forenses⁶⁶.

Otro de los posibles factores que posiblemente resulte ser un problema para observar espermatozoides mediante la tinción Christmas tree, son las diluciones a las que son sometidas las muestras, y de acuerdo con Zagal Ramos, en su estudio, evaluó muestras de semen de 1 a 5 semanas en diluciones 1/2, 1/4 y 1/100, y como resultado se obtuvo que en todas la diluciones realizadas se apreciaba espermatozoides, pero a partir de la semana 5 empezó a darse la degradación de espermatozoides, pero solamente en la dilución 1/100, llegando a la conclusión de que debido a que en el semen humano existe millones de espermatozoides, no resulta ser un problema al momento de realizar diluciones⁵¹.

CONCLUSIONES

- Los métodos inmunológicos responden al principio de la interacción antígeno-anticuerpo, y al ser utilizados en el análisis forense tienen como finalidad la indagación de marcadores bioquímicos que se encuentran en el semen. La P-30 o PSA, considerado el mejor marcador bioquímico para la investigación de delitos sexuales, mediante Elisa se usa en un 61,09%, la FAP se encuentra en niveles altos en el semen luego de la agresión sexual, adquiriendo importancia en muestras oligozoospermicas y azoospermicas, siendo analizada en un 29,76%, finalmente la seminogelina de acuerdo a la investigación es el marcador con más escasez de análisis en muestras de delitos sexuales (9,13%).
- Dentro de la investigación forense la utilización de un protocolo estandarizado es esencial en todo momento, la toma de muestras más el consentimiento de la víctima, debe cumplir con las condiciones para el hallazgo de todas las características, circunstancias y tiempo transcurrido en los que se dieron los acontecimientos. La finalidad de un protocolo forense es salvaguardar el bienestar de la víctima, así como las evidencias durante su recogida, conservación, envío y análisis que ayuden a aclarar si sucedió o no agresión sexual, además ofrece beneficios como la minimización de errores durante todo el proceso de investigación amparado todo el tiempo por la cadena de custodia.
- El rastreo de espermatozoides en muestras de delitos sexuales mediante la microscopía es una prueba importante en el laboratorio forense, el hallazgo de células espermáticas es posible gracias a tinciones auxiliares que mediante colorantes permiten el contraste a la muestra. La tinción de Christmas Tree o Árbol de Navidad, es específica para el rastreo de espermatozoides, usada de manera frecuente en un 51,83%, seguida por Gram (22,36%), Papanicolaou (9,35%), Hematoxilina brillante (9,35%), Cristal violeta (6,10%) y Baeccchi (1,02%), todas con la finalidad de confirmar la presencia de semen del posible agresor, permitiendo el esclarecimiento de los hechos.

RECOMENDACIONES

- Fomentar las buenas prácticas dentro de los laboratorios forenses, asegurándose que los profesionales cuenten con conocimientos sobre todos los análisis forenses, ya que estos podrían determinar el origen de los indicios encontrados, mediante técnicas inmunológicas, bioquímicas y microscópicas, ofreciendo la posibilidad de obtener rápidos resultados lo que permite continuar con análisis posteriores.
- Concientizar a los profesionales del ámbito forense sobre el correcto manejo de los indicios biológicos como parte de una correcta evaluación integral oportuna de las víctimas de abuso sexual, realizando una intervención pericial respetuosa con la víctima, integrando siempre principios ético-legales en la recogida, preservación, envío y análisis de las evidencias recogidas en un posible delito sexual.
- Impulsar el interés de la investigación en estudiantes y profesionales de nuestro país, acerca de estudios que aporten información actualizada sobre los distintos métodos de análisis que se usen en los centros forenses del país, para la adquisición de nuevos conocimientos contribuyendo al mejoramiento de la administración de la justicia buscando que se garantice la protección de los derechos de las víctimas de abuso sexual que hoy en día abarca a niños, niñas y adolescentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. COIP. Código orgánico Integral Penal. [Online]. 2014. Available from: https://tbinternet.ohchr.org/Treaties/CEDAW/Shared%20Documents/ECU/INT_CEDAW_ARL_ECU_18950_S.pdf
2. Higa E. Casos de violencia sexual aumentan 15 % en Japón [Internet]. Prensa Internacional - Noticias de Japón en español. Prensa Internacional Digital; 2020 [citado el 2 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://internationalpress.jp/2020/11/09/casos-de-violencia-sexual-aumentan-15->
3. Organización de las Naciones Unidas. Aumentan las denuncias de violencia sexual en Ucrania [Internet]. Noticias ONU. 2022 [citado el 2 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2022/06/1509792>
4. De Blas A. Radiografía de la violencia sexual: las denuncias suben, la mitad de las víctimas son menores [Internet]. Geo Violencia Sexual. Asociación La Sur - Femicidio.net; 2022 [citado el 13 de julio de 2022]. Disponible en: <https://geoviolenciasexual.com/radiografia-de-la-violencia-sexual-las-denuncias-suben-la-mitad-de-las-victimas-son-menores/>
5. Velasco P. Los delitos sexuales y las violaciones suben un 32% en 2021 y encabezan la estadística de criminalidad [Internet]. Cadena SER. 2021 [citado el 13 de julio de 2022]. Disponible en: https://cadenaser.com/ser/2021/09/17/tribunales/1631891589_705836.html
6. El oscuro panorama de la violencia contra las mujeres en EEUU [Internet]. Com.tr. [citado el 13 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.aa.com.tr/es/mundo/el-oscur-panorama-de-la-violencia-contra-las-mujeres-en-eeuu/1999310>
7. Red Nacional de Violación, Abuso e Incesto. Statistics [Internet]. Rainn.org. [citado el 2 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.rainn.org/statistics>
8. México A. Aumentaron 87% los delitos de abuso sexual en los últimos 5 años; niños, niñas y adolescentes sufren múltiples formas de violencia sexual: [Internet]. Alumbra. 2021 [citado el 13 de julio de 2022]. Disponible en: <https://alumbramx.org/aumentaron-87-los-delitos-de-abuso-sexual-en-los-ultimos-5-anos-ninos-ninas-y-adolescentes-sufren-multiples-formas-de-violencia-sexual-alumbra/>
9. Chequeando. ¿Qué muestran las estadísticas sobre delitos de abuso sexual? [Internet]. Chequeado. 2022 [citado el 19 de julio de 2022]. Disponible en:

<https://chequeado.com/hilando-fino/que-muestran-las-estadisticas-sobre-delitos-de-abuso-sexual/>

10. Gallo D. Violación en Palermo: se denuncian cada día 79 ataques sexuales en la Argentina [Internet]. LA NACIÓN. 2022 [citado el 19 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.lanacion.com.ar/seguridad/violacion-en-palermo-se-denuncian-cada-dia-79-ataques-sexuales-en-la-argentina-nid02032022/>
11. France. Brasil registró una violación de mujer cada 10 minutos en 2021, según informe [Internet]. France 24. 2022 [citado el 19 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.france24.com/es/minuto-a-minuto/20220307-brasil-registr%C3%B3-una-violaci%C3%B3n-de-mujer-cada-10-minutos-en-2021-seg%C3%BAn-informe>
12. Baena M. Los menores de 14 años son el 61,3 % de las víctimas de violencia sexual en Brasil [Internet]. EFEMINISTA. 2022 [citado el 19 de julio de 2022]. Disponible en: <https://efeminista.com/menores-victimas-violencia-sexual-brasil/>
13. Infobae. Aumentan los casos de violencia sexual cometidos por parejas o exparejas en Colombia [Internet]. infobae. 2022 [citado el 13 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.infobae.com/america/colombia/2022/06/13/aumentan-los-casos-de-violencia-sexual-cometidos-por-parejas-o-exparejas-en-colombia/>
14. PDI. Delitos sexuales: balance primer trimestre 2021 [Internet]. PDI Chile. [citado el 27 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.pdichile.cl/centro-de-prensa/detalle-prensa/2021/05/12/delitos-sexuales-balance-primer-trimestre-2021>
15. Fiscalía General del Estado. Análisis de la Violencia de Género. Edu.ec [Internet]. 2020 [consultado 28 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.epn.edu.ec/wp-content/uploads/2020/11/ana%CC%81lisis-de-la-violencia-de-genero-en-ecuador-2020.-20-11-2020ai.pdf>
16. Pazmiño LB. Estas son las cifras de violencia contra la mujer del primer trimestre de 2022 [Internet]. GK. 2022 [citado el 19 de julio de 2022]. Disponible en: <https://gk.city/2022/05/08/cifras-violencia-contra-mujer-ecuador-hasta-marzo-2022/>
17. Defensoría Pública del Ecuador. DELITOS CONTRA LA INTEGRIDAD SEXUAL TIENEN MAYOR DEMANDA EN LA DEFENSORÍA PÚBLICA [Internet]. Gob.ec. [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.defensoria.gob.ec/?project=delitos-contra-la-integridad-sexual-tienen-mayor-demanda-en-la-defensoria-publica>

18. Fiscalía General del Estado. INFORME DE RENDICIÓN DE CUENTAS 2020 [Internet]. Gob.ec. [citado el 27 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.fiscalia.gob.ec/transparencia/2021/Rendicion-de-cuentas/Chimborazo/INFORME-CHIMBORAZO.pdf>
19. Fiscalía General del Estado. INFORME DE RENDICIÓN DE CUENTAS 2020 Gob.ec. [citado el 27 de julio de 2022]. Disponible en: https://www.fiscalia.gob.ec/transparencia/2022/Rendicion-de-cuentas/Chimborazo/INFORME-CHIMBORAZO_2021.pdf
20. Jhonson D, Peterson J, Sommers I, Baskin D. Use of Forensic Science in Investigating Crimes of Sexual Violence: Contrasting Its Theoretical Potential With Empirical Realities. *Violence against woman*. 2012; 18(2):193-222.
21. Ramos B, Córdova M, Salas O, Hernández JC, Guardiola M, Solis E. Biological Evidence Analysis in Cases of Sexual Assault. *Biochemical Analysis Tools*. 2019.
22. Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T. Current Methods for Body Fluid Identification Related to Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid. *Diagnostics*. 2020; 10(9): 1-12.
23. Quintero Vásquez G, Bermúdez Cruz R, Castillo Cadena J. Infertilidad Masculina y Fragmentación del ADN Espermático: Un Problema Actual. *Rev Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. [Internet] 2015. [citado el 15 de agosto de 2022]; 18 (2): 144-155
24. Boron W, Boulpaep E. *Fisiología Médica*. Elsevier. [Internet] 2017 [Consultado 28 de junio de 2022]. 1092-1107. Disponible en: [file:///C:/Users/USER/AppData/Local/Temp/Rar\\$Dib13768.39803/Fisiologia%20Medica%20Boron%20Boulpaep%203a%20Edicion_booksmedicos.org.pdf](file:///C:/Users/USER/AppData/Local/Temp/Rar$Dib13768.39803/Fisiologia%20Medica%20Boron%20Boulpaep%203a%20Edicion_booksmedicos.org.pdf)
25. Ayón Rosana M. *Biología Forense, Botánica, ficología, micología, entomología, tafonomía y genéticas aplicadas a la criminalística*. OPERA LILLOANA. [Internet] 2019 [Consultado el 28 de junio de 2022]; 54: 22-29. Disponible en: <http://www.lillo.org.ar/revis/opera-lilloana/2019-ol-v54.pdf>
26. Medlineplus. Trayectoria de emisión de esperma [Internet]. Medlineplus.gov. [Consultado el 19 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/anatomyvideos/000121.htm>
27. Cisneros J, Villaroel C. 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: Universidad Nacional de Chimborazo ; 2016. [Internet]. Edu.ec. [citado el 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1529/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2016-0009.pdf>
28. Revista M, Granma M, Aspectos FH, Revisión Bibliográfica M, Rafael Gutiérrez Núñez EE, Med E, et al. UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE GRANMA [Internet]. Medigraphic.com. [citado el 19 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/multimed/mul-2018/mul186o.pdf>
29. Ballesca JL, Vazquez-Levin M, Castillo J, Jodar Meritxell, Oliva R. El espermatozoide “Un breve recorrido entre el mito y la historia del ayer a la ciencia de hoy”. [Internet]. Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción humana. [citado el 19 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://www.revistafertilidad.org/rif-articulos/-el-espermatozoide--ldquo-un-breve-recorrido-entre-el-mito-y-la-historia-del-ayer--a-la-ciencia-de-hoy-rdquo-/292>
30. Castellón E, Cesari A, Fornés M. Biología de la gameta masculina. EUDEM. [Internet]. 2018 [citado el 19 de septiembre de 2022]; 1: 13-16 Disponible en: <http://www2.mdp.edu.ar/images/eudem/pdf/biologia%20de%20la%20gameta%20masculina.pdf>
31. Pérez Yauli VL, Tamayo Viera JO, Molina Arcos IA. Los tipos de delitos contra la libertad sexual en el contexto social en la provincia de Tungurahua. Revista Científica UISRAEL [Internet]. 2022 [citado el 16 de agosto de 2022]; 9(1):159–77. Disponible en: <https://revista.uisrael.edu.ec/index.php/rcui/article/view/503/529>
32. Fiscalía General del Estado del Ecuador. Manuales, Protocolos, Instructivos y Formatos del Sistema Especializado Integral de Investigación Legal y Ciencias Forenses. [Internet] Gob.ec. [citado el 20 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cienciasforenses.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/registro-oficial-318-MANUALES-PROTOCOLOS.pdf>
33. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. La escena del delito y las pruebas materiales Sensibilización del personal no forense sobre su importancia [Internet]. Unodc.org. [citado el 20 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/scientific/Crime_scene_Ebook.Sp.pdf

34. Old J, Schweers BA, Boonlayangoor PW, Fischer B, Miller KWP, Reich K. Validación del desarrollo de RSID™ -Semen: una tira de prueba inmunocromatográfica de flujo lateral para la detección forense de semen humano: tira de prueba inmunocromatográfica para la detección forense de semen humano. J Ciencia forense [Internet]. 2012 [citado el 30 de septiembre de 2022];57(2):489–99. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22211796/>
35. Boward ES, Wilson SL. Una comparación de los kits de prueba ABACard(®) p30 y RSID™ - Semen para la identificación forense de semen. J Forensic Leg Med [Internet]. 2013 [citado el 30 de septiembre de 2022];20(8):1126–30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24237835/>
36. Independent Forensics. RSID™ -Semen R. USO PREVISTO [Internet]. Cosmobio.co.jp. [citado el 30 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/IFI_/0230.20160225.pdf
37. Cipriano González AG, López Palma HM. Fundamento bioquímico de fosfatasa acida prostática como prueba orientativa en el delito de violación. ECCIÓNS. Criminológica-criminalística [Internet]. Edu.mx. [citado el 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: http://revista.cleu.edu.mx/new/descargas/2002/Articulo06_fundamento_bioquimico_fosfatasa_acida_prostatica.pdf
38. Bouvet B, Paparella C, Ombrella A, Pavesi A. Marcadores bioquímicos de plasma seminal y su aplicación en el laboratorio forense para detectar semen en manchas [Internet]. Edu.ar. [citado el 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/9888/MARCADORES%20BIOQU%c3%8dM%20ICOS%20DE%20PLASMA%20SEMINAL%20Y%20SU%20APLICACI%c3%93N%20EN%20EL%20LABORATORIO%20FORENSE%20PARA%20DETECTAR%20SEMEN%20EN%20MANCHAS.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
39. Montenegro Villegas B, Milagritos DK, Jara C. Universidad Privada Norbert Wiener Escuela de Posgrado Tesis “Aplicación del reactivo fosfatasa acida de uso clínico para la determinación de presencia de fluido seminal con fines forenses en el laboratorio clínico hyd salud -2021.” para optar el grado de: maestro en ciencia criminalística [Internet]. Edu.pe. [citado el 23 de noviembre de 2022]. Disponible en:

https://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13053/6639/T061_43141820_M.pdf?sequence=1&isAllowed=y

40. Mayta Q, Sergio E. Investigación forense del Antígeno Específico de Próstata (PSA) en delitos de agresión sexual, en diversos fluidos biológicos humanos de interés forense. RevCsFarm y Bioq [Internet]. 2015 [citado el 23 de noviembre de 2022];3(1):61–7. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652015000100007
41. Uria Butron MT. Persistencia promedio de antígeno prostático específico, en muestras de interés forense [Internet]. Umsa.bo. [citado el 23 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/25308/TM-2001.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
42. Frías García JL, Cáceres Manzano VP, Monge Moreno AM, Lescano Fonseca PJ. Investigación científica forense mediante técnicas de coloración en casos de delito sexual. Ciencia Digital [Internet]. 2019 [citado el 24 de noviembre de 2022];3(1.1):90–8. Disponible en: <https://cienciadigital.org/revistacienciadigital2/index.php/CienciaDigital/article/view/361>
43. Solares Reyes E, García Jiménez M. Violación sexual de menores [Internet]. Gob.gt. Instituto Nacional de Ciencias Forenses de Guatemala; 2018 [citado el 24 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.inacif.gob.gt/index.php/servicios/k2-blog/item/28-violacion-sexual-de-menores>
44. Frías García JL. Comparación de la técnica de Eosina y Christmas tree para el rastreo de espermatozoides en casos de delitos sexuales en el centro de investigación de ciencias forenses Ambato – Tungurahua, en el periodo julio – diciembre 2016 [Internet]. Universidad Nacional de Chimborazo; 2016 [citado el 24 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.inacif.gob.gt/index.php/servicios/k2-blog/item/28-violacion-sexual-de-menores>
45. Salame Ortiz MA, Pérez Mayorga BC, San Lucas Solórzano MF. La víctima en los delitos contra la integridad sexual. Universidad y Sociedad [Internet]. 2020 [citado el 20 de marzo de 2023];12(3):353–63. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202020000300353
46. Almaral Rodríguez H. Cuantificación de la fosfatasa ácida total y prostática, y su importancia en la investigación forense. Universidad de Carabobo, Facultad de Derecho. Centro de Investigaciones Penales y Criminológicas. [Internet]. 2012 [citado el 20 de marzo de 2023]. 90-117. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/derecho/revista/relcrim22/art04.pdf>

47. Rozo Malaver María F. La mujer como sujeto especial de protección en las políticas públicas de desplazamiento forzado: una muestra de la realidad. Universidad Católica de Colombia. [Internet]. 2014 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://repository.ucatolica.edu.co/server/api/core/bitstreams/fc3ed5ba-4a59-4861-8056-072380d7a097/content>
48. Abdel Rahman A, Khater S, Attia E. Rapid Stain Identification (RSID-TMSemen): A rapid tool for seminal fluid detection. *Ain Shams Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology* [Internet]. 2020 [citado el 20 de marzo de 2023];35(2):73–80. Disponible en: https://ajfm.journals.ekb.eg/article_111862.html
49. Nakanishi H, Hara M, Takahashi S, Takada A, Saito K. Evaluation of forensic examination of extremely aged seminal stains. *Leg Med (Tokyo)* [Internet]. 2014 [citado el 20 de marzo de 2023];16(5):303–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24844186/>
50. Rodríguez JJRB, Calacal GC, Laude RP, De Ungria MCA. Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example. *Egypt J Forensic Sci* [Internet]. 2019;9(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s41935-019-0149-z>
51. Pérez Valencia Estefanía S. Determinación de positividad de p30 de acuerdo al intervalo de tiempo transcurrido desde el hecho hasta toma de muestra vaginal en delitos contra la integridad sexual en Unidad de Flagrancia Enero - Julio 2017. Quito: UCE; 2018
52. Zagal Ramos O. Identificación de fosfatasa ácida, P30 y espermatozoides, recabadas en hisopos a distintas diluciones y tiempos de almacenamiento. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. [Internet] 2016 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/14485>
53. Álvarez V, Dolores M. Pruebas de biología forense en correlación con violencia sexual en Ambato - Tungurahua. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Graduados. [Internet] 2016. [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/40613>
54. Mayta Q, Sergio E. Investigación forense del Antígeno Específico de Próstata (PSA) en delitos de agresión sexual, en diversos fluidos biológicos humanos de interés forense. *RevCsFarm y Bioq* [Internet]. 2015 [citado el 20 de marzo de 2023];3(1):61–7. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652015000100007

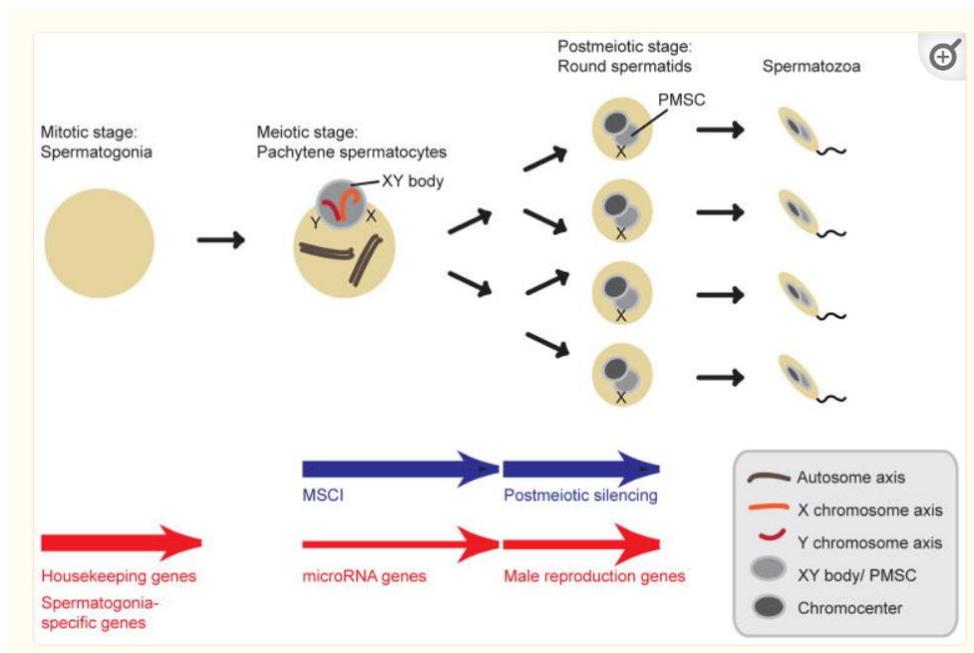
55. Vega Vega C, Navarro Escayola E, Vega V, Navarro EE. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN MÉDICO-FORENSE EN LOS DELITOS CONTRA LA LIBERTAD SEXUAL: REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN [Internet]. Www.uv.es. [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.uv.es/gicf/4A2_Vega_GICF_41.pdf
56. Consejo Médico Forense. Protocolo de actuación médico-forense ante la violencia sexual en los Institutos de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Gobierno de España. [Internet] 2021 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.mjusticia.gob.es/es/ElMinisterio/OrganismosMinisterio/Documents/ProtocoloViolenciaSexual.pdf>
57. Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. Protocolo unificado de los ministerios públicos de la República Argentina. Guía para el levantamiento y conservación de la evidencia. Argentina. [Internet] 2017 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://www.jus.gob.ar/media/3262247/Protocolo%20unificado.pdf>
58. Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. Protocolo para la Atención Integral de Personas Víctimas de Violaciones Sexuales. Instructivos para Equipos de Salud. Argentina. [Internet] 2017 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: https://data.miraquetemiro.org/sites/default/files/documentos/Protocolo_Violencia_Sexual%20Argentina.pdf
59. Romanini MT. Propuesta de protocolo de abordaje de mujeres víctimas de delitos sexuales que son atendidas en la sección clínica médico forense y en las unidades médico legales del departamento de medicina legal del organismo de investigación judicial de Costa Rica [Internet]. Scielo.sa.cr. [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v31n2/art02v31n2.pdf>
60. Fiscalía de la Nación Ministerio Público. Guía Médico Legal. Evaluación Física de la Integridad Sexual en Presuntas Víctimas de Delitos Contra la Libertad Sexual. Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Perú [Internet]. 2021 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://img.lpderecho.pe/wp-content/uploads/2018/11/Guia-Medico-Legal-Evaluacion-fisica-de-la-integridad-sexual-en-presuntas-victimas-contrala-libertad-sexual-3%C2%B0-Version-2021-LP-DERECHO.pdf>
61. Peña Morejón ME, Chango Brito CJ. “Protocolo para la toma de muestras en delitos a personas víctimas de Agresión Sexual en el Centro de Investigación de Ciencias Forenses-Tungurahua,

durante el período mayo – octubre 2015”. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, 2016.; 2016.

62. Fuentes G, Ruth L. Identificación de vestigios de semen en casos de delitos sexuales y su importancia en la investigación forense en Panamá. Amelica.org. [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/325/3253232002/3253232002.pdf>
63. Esquivias Ramírez Williams Enrique. Estudio de las variaciones Morfológicas y tiempo de permanencia de los espermatozoides impregnados en dos tipos de soporte sometidos al efecto *Escherichia Coli*, con fines en la investigación forense. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. [Internet]. Edu.pe. [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/7108/CHMesrawe.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
64. López Támara K. Reconocimiento e Identificación de Manchas de Semen en Diferentes Soportes de Interés Forense. Universidad Nacional Federico Villareal. Perú [Internet]. 2013 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: https://nanopdf.com/download/reconocimiento-e-identificacion-de-manchas-de_pdf#
65. Reina-Bouvet B, Beatriz-Pavesi A, Vicenta-Paparella C, María-Ombrella A. Identificación de espermatozoides humanos en muestras contaminadas con levaduras. CienciaUAT [Internet]. 2017 [citado el 20 de marzo de 2023];12(1):23. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582017000200023
66. García Jiménez MA. Asociación de resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala [Internet]. 2012 [citado el 20 de marzo de 2023]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3310.pdf
67. Moscoso Moreno NK, Chávez Vera LF. Evaluación de técnica dependientes para el análisis forense en soportes sólidos en la validación de delitos sexuales. Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo, 2018.

ANEXOS

Anexo 1: Espermatogénesis



Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4510947/>

Anexo 2: Semen



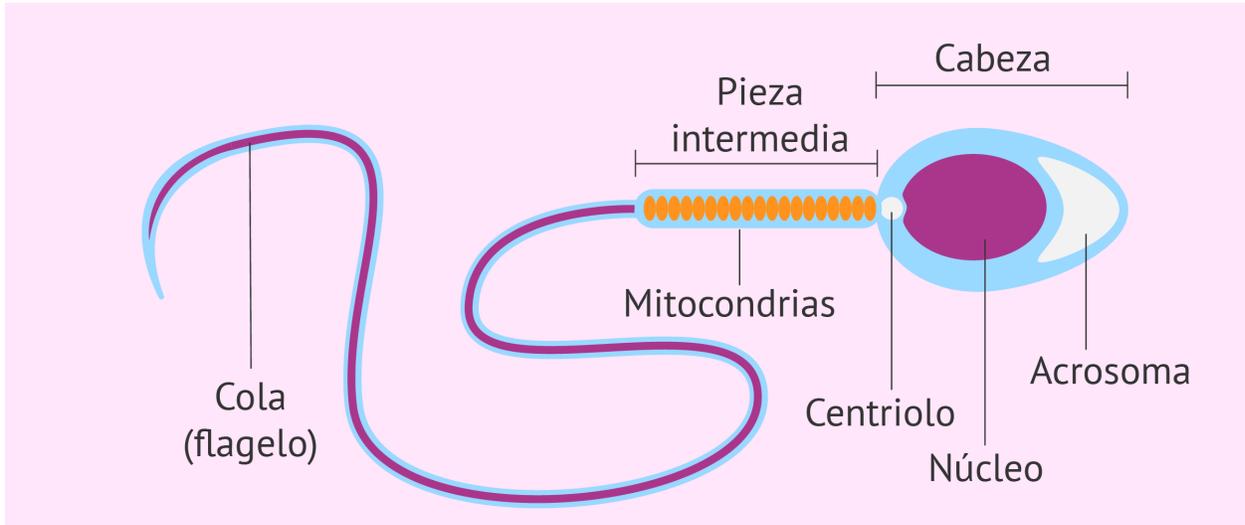
Fuente: <https://n9.cl/bjb17>

Anexo 3: Composición del semen

Composición del Líquido Seminal	Composición de la Próstata
<ul style="list-style-type: none">• Fructosa• Aminoácidos• Fosforo• Potasio• Hormonas	<ul style="list-style-type: none">• Ácido cítrico• L-carnitina• Fosfatasa alcalina• Calcio• Sodio• Zinc• Potasio

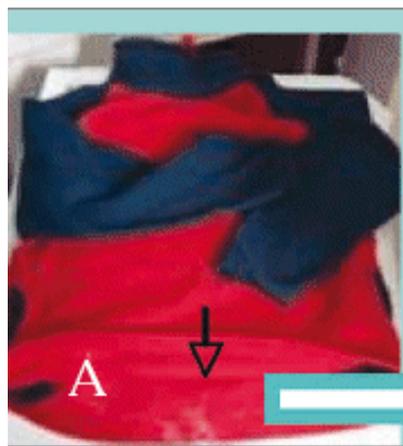
Fuente: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1529/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2016-0009.pdf>

Anexo 4: Espermatozoides



Fuente: <https://www.reproduccionasistida.org/espermatozoide/>

Anexo 5: Semen en soporte sólido



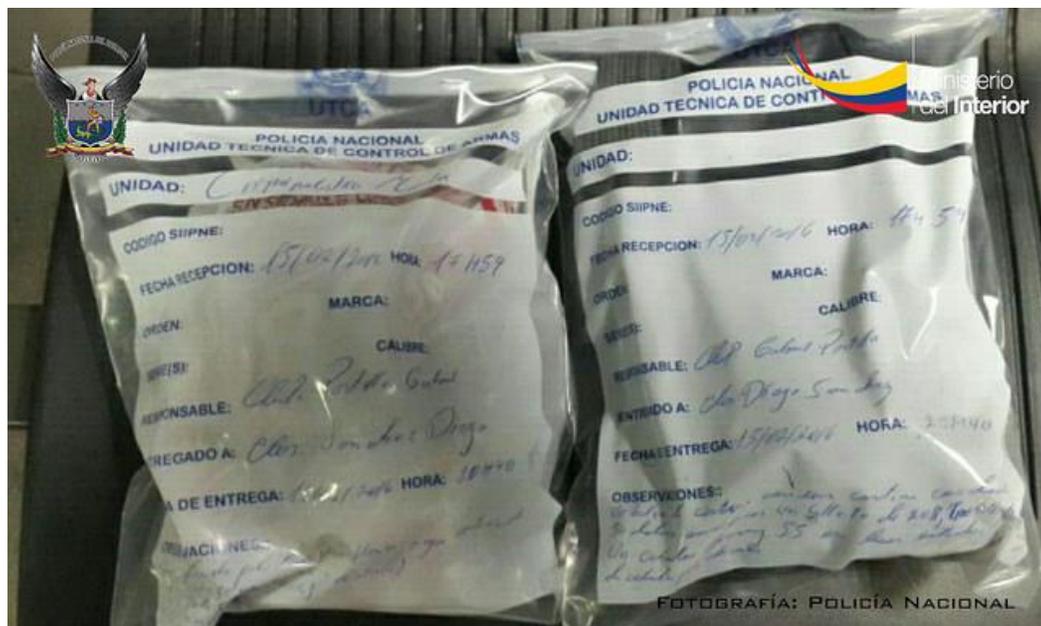
Fuente: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582009000100002

Anexo 6: Formato de Cadena de Custodia

CADENA DE CUSTODIA	
Fecha:/...../.....	
Las muestras han sido envasadas y etiquetadas por:.....	
Fecha de remisión de muestras al laboratorio:...../...../.....	
Condiciones de almacenaje hasta su envío:.....(llenar si procede)	
Transporte efectuado por:.....Firma:.....	
Recibe en el laboratorio:.....Cargo:.....	
Fecha:...../...../.....Hora:.....Firma:.....	

Fuente: <https://www.cienciasforenses.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/registro-oficial-318-MANUALES-PROTOCOLOS.pdf>

Anexo 7: Ejemplo de Cadena de Custodia



Fuente:

<https://www.ministeriodegobierno.gob.ec/detenida-por-presunta-falsificacion-de-documentos-y-sellos-en-manta/>

Anexo 8: Inserto Seminogelina

Independent Forensics

Rapid Stain Identification Of Human Semen (RSID™-Semen) Technical Information and Protocol Sheet for Use with Universal Buffer, cat# 0230

INTENDED USE

RSID™-Semen is designed for fast, easy, and reliable detection of human semen from a variety of samples encountered by forensic laboratories including clothing, bedding, vaginal swabs, prophylactics, and stained surfaces.

The test will detect as little as 1 µL of human semen, and test results are complete within 10 minutes.

The detection protocol can be completely integrated into standard forensic laboratory procedures for DNA analysis, prior to STR analysis. The test sensitivity has been adjusted so that when semen is detected, sufficient biological material should be present to generate an STR profile (exceptions include low sperm count semen or semen from vasectomized men).

This is the first commercially available confirmatory test for human semen. No other human body fluids or animal semen samples tested cross react with RSID™-Semen. The immunochromatographic strip test uses dual monoclonal antibodies specific for human semenogelin: *the test does not detect PSA or P30.*

The new RSID™ - Universal Buffer is designed for use with Independent Forensics' RSID™-Saliva, RSID™-Semen and RSID™-Blood tests. Using RSID™ - Universal Buffer, forensic labs can now extract one sample using a single buffer, and test for three different body fluids: *one sample, one buffer, three body fluid tests.* The use of a single buffer will enable forensic laboratories to minimize sample consumption without compromising the specificity or sensitivity for the detection of saliva, semen, and blood.

Introduction

RSID™-Semen is a lateral flow immunochromatographic strip test that uses two anti-human semenogelin monoclonal antibodies in a lateral flow format, to detect the presence of semenogelin. Semenogelin is a protein produced by the seminal vesicles and is responsible for the coagulum associated with ejaculate. RSID™-Semen uses.

RSID™-Semen is specific for human semen and has numerous advantages over other methods for semen detection, including increased sensitivity, specificity, and speed. Current identification methods for semen are presumptive (provide a basis for continued analysis of the tested exhibit, but are not specific for semen), and are therefore open to legal and scientific challenge.

Principle of the Test

RSID™-Semen is an immunochromatographic assay that uses two mouse monoclonal antibodies specific for human semenogelin. One of these antibodies is conjugated to colloidal gold and is deposited on a conjugate pad beneath the sample window. The other antibody is striped onto the

"Test line" on a membrane attached to the conjugate pad. The "Control line" on the membrane consists of anti-mouse IgG antibody and is used as an internal control.

Following the addition of test liquid to the conjugate pad, sample and antibodies (complexed and free) are transported by bulk fluid flow to the membrane. The immobilized anti-semenogelin antibodies on the test line capture the semenogelin antigen-antibody-colloidal gold complexes, producing a red line at the Test position. If no human semenogelin is present in the sample, no red line will appear. A red line should appear at the Control position on each strip. This demonstrates that the sample fluid was transported through the length of the test, and that the components of the strip test are working correctly.

Principle of the RSID™ - Universal Buffer

The components of the RSID™- Universal Buffer are designed to efficiently extract semenogelin from questioned stains and swabs and to dissolve the antibody-colloidal gold conjugate from the conjugate pad, maintain an extract at the appropriate pH, and facilitate correct running of the test. The components of the Universal Buffer have been optimized to allow *one sample, one buffer, three body fluid tests* without compromising sensitivity or specificity of the analysis. Components include buffer and salts (Tris, NaCl, KCl) for physiological stability, a chelating agent (EDTA) for stability, detergents and surfactants (Triton X-100 and Tween 20) for extraction efficiency and solubility maintenance, protein (BSA) for reducing non-specific adsorption and loss,

Reagents and Materials Provided

- i) Test cassettes: 25 cassettes individually wrapped and sealed in a moisture-proof foil (a silica gel desiccant pouch has been added for increased shelf life.)
- ii) 30 mL of RSID™- Universal Buffer.

Protocol for Positive Control

Positive controls for RSID™-Semen can be produced from 50 µL of human semen deposited on a cotton swab. The semen swab should be extracted in 1 mL of RSID™- Universal Buffer for 1-2 hours at room temperature; 5 µL of this extract should be diluted in 95 µL of RSID™- Universal Buffer (total volume 100 µL). Load all 100 µL into the sample well; this will give a clear positive signal.

Protocol for Negative control

A negative control for RSID™-Semen can be produced from extracting a sterile cotton swab in the same manner as your samples. Alternatively, 100 µL of RSID™- Universal Buffer may be added to the cassette and run as normal.

Suggested Extraction Protocol for Sample Analysis

Forensic samples obtained on cotton swabs should be extracted in 200-300 μL of RSID™- Universal Buffer for 1-2 hours. Alternatively, a portion of a swab may be used, and sufficient RSID™- Universal Buffer should be added to easily cover the sample. Stains on fabric or paper should be sampled by taking a punch or cutting ($\approx 20 \text{ mm}^2$) of the item. The punch or cutting should be extracted in 100 μL of RSID™- Universal Buffer for 1-2 hours. A general guideline of a maximum of 10% of extract, up to a maximum of 20 μL should be run. The remainder of the extract can be processed for STR analysis using any one of a number of DNA extraction protocols. The buffer provided is STR free and contains a DNA stabilizer. The provided buffers do not interfere with extraction or amplification.

Strip Test Assay Procedure

Note: Assays should be performed at room temperature. It is recommended that a positive and negative control be included with every assay.

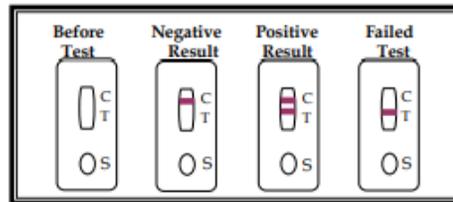
1. Remove cassette from the foil pouch. Discard silica gel desiccant.
2. Combine extract aliquot (max of 20 μL) with RSID™- Universal Buffer to bring test sample to a total volume of 100 μL .
3. Add sample in RSID™- Universal Buffer to sample window. Start timing at the point the sample is added to the sample window.
4. Due to the High Dose Hook Effect, samples giving a weak positive or negative result should be diluted 1:20 and re-tested. For example: If 20 μL from a 200 μL swab extract gives a weak positive or negative result, 1 μL from the original extract should be added to 99 μL RSID™- Universal Buffer and analyzed on a new cassette (see High Dose Hook Effect below for details).
5. At 10 minutes, score and record results as shown in the Scoring Results diagram shown below.

Alternatively, users may add 100 μL from the extraction to the cassette of RSID™-Semen. This will have little to no effect on the sensitivity or specificity of the test; however, any problems encountered by the high dose hook effect or using a concentrated sample (e.g., altered pH) may be avoided if the extraction is diluted in RSID™- Universal Buffer, as described above.

Scoring Results

RSID™-Semen should be evaluated *exactly* 10 minutes after the addition of sample. Fig. 1 illustrates expected results:

- i) A visible red line at the Control (C) position only indicates a negative result.
No human semen detected.
- ii) Visible red lines at both the Control (C) and Test (T) positions indicate a positive result.
Human semen detected.
- iii) A visible red line at the Test (T) position only indicates a failed test.
Test failure, no conclusion possible.



Stability and Storage

RSID™-Semen cassettes should be stored at room temperature. RSID™- Universal Buffer should be stored at 2-8°C. Do not use buffer or cassettes after the printed expiration date.

Specificity

RSID™-Semen is specific for human semenogelin. No cross-reactivity with human saliva, whole blood, vaginal fluid, menstrual blood, breast milk or urine has been observed.

No cross reactivity with animal semen has been observed. Species tested: chimp, gorilla, dog, cat, mouse, cow, horse, pig, goat, and sheep.

Test Sensitivity

The detection limit for RSID™-Semen, used as suggested, is $< 1 \mu\text{L}$ of human semen.

Undiluted semen should *not* be used with RSID™-Semen, as the viscosity of the sample prevents proper release of the conjugate from the conjugate pad. The tested sample should first be deposited on a sterile cotton swab, extracted in RSID™- Universal Buffer, and diluted as needed in RSID™- Universal Buffer before analysis with RSID™-Semen.

High Dose Hook Effect

A high dose Hook effect refers to reduction on test line signal on immunochromatographic strip tests when very high levels of target are present in the tested sample. Under these conditions, unbound target antigen can reach the test line *before* the colloidal gold-labeled antibody-bound antigen, occupying the test line antibody sites and possibly resulting in a weak positive or false negative result.

Weak positives can be observed with RSID™-Semen when samples containing large amounts of human semen (≈ 3 to 50 μL) are analyzed. 20-fold dilution of these samples and re-testing with RSID™-Semen eliminates the weak positive and false negative results (see Validation Summary online).

*Not for in vitro diagnostic use
Manufactured by:*

 **Independent Forensics**

500 Waters Edge, Suite 210, Lombard IL 60148
p 866.434.2400, f 708.978.5115
WWW.IFI-TEST.COM/RSID.PHP

RSID™ Semen Universal Buffer, April 2011

Fuente:

https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/IFI_/0230.20160225.pdf

Anexo 9: Inserto FAP

es

PHOSPHATESMO KM

Papel de prueba para la identificación de fosfatasa ácida
(para la identificación de manchas de esperma en investigaciones policiales y la medicina forense)

Presentación:

25 tiras de papel de prueba de 15 x 30 mm, selladas cada una por separado en láminas de plástico y presentadas en envase de aluminio.

Reacción cromática:

PHOSPHATESMO KM reacciona con la fosfatasa ácida (manchas de esperma), apareciendo entonces unas manchas de color violado sobre fondo blanco.

Instrucciones para el uso:

Revisar macroscópicamente el material portador de los vestigios para descubrir los puntos sospechosos. Los textiles presentan una consistencia similar a madera, y bajo la lámpara de cuarzo normalmente una fluorescencia azulada, blanca o amarillenta. La ventaja de PHOSPHATESMO KM consiste en la posibilidad de cerciorarse en el lugar del hecho mediante unas pruebas rápidas y aclaradoras si los vestigios descubiertos proceden de esperma o no. Recortar o raspar del material sospechoso una muestra de unos cuantos mm² y ponerla al remojo en agua o solución fisiológica. Tomar únicamente la cantidad absolutamente necesaria de las tiras de papel de prueba. Después de haber sacado las tiras de prueba, volver a cerrar inmediatamente el envase. Dejar al descubierto el papel PHOSPHATESMO KM, para lo cual se asirán los extremos despegados de la lámina de plástico que se abrirá de un tirón. No tocar el papel de prueba con los dedos. Tomar la muestra húmeda y puesta al remojo durante aproximadamente 1 minuto para colocarla sobre el papel de prueba. A los pocos segundos se notará una coloración violeta evidente, en caso de presencia de fosfatasa ácida.

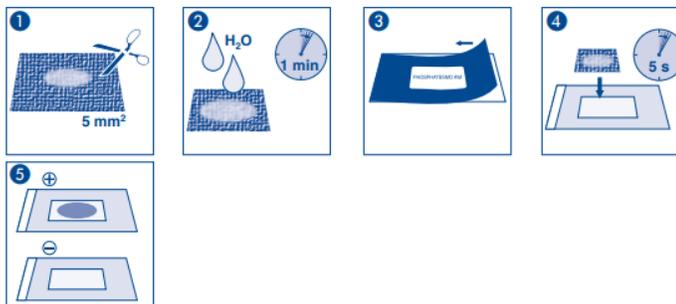
Especificidad:

PHOSPHATESMO KM es específico para la fosfatasa ácida. La reacción no supe la necesaria identificación microscópica de espermatozoides intactos.

Estabilidad:

Proteger las tiras del papel de prueba contra la acción de la luz solar y de la humedad. Guardar el estuche en sitio fresco y seco (temperatura de almacenamiento no superior a + 30 °C).

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6-8 · 52355 Düren · Alemania
Tel.: +49 24 21 969-0 · Fax: +49 24 21 969-199 · info@mn-net.com · www.mn-net.com



REF	Artikelnummer / Item number / Référéncie produit / Referencia / Artikelnummer / Numero di catalogo / Numer artykułu	LOT	Chargencode / Batch identification / Numéro de lot / Código de lote / Productienummer / Codice del lotto / Numer partii
	Achtung! / Warning! / Attention! / ¡Atención! / Let op! / Attenzione! / Uwaga!		Verwendbar bis / Use by / À utiliser avant / Fecha de caducidad / Te gebruiken tot / Utilizzare entro (anno / mese) / Przydatność do użycia
	Temperaturbegrenzung / Permitted storage temperature range / Limites de température / Limites de temperatura / Temperatuurbegrenzung / Limite de tem- peratura / Ograniczenie temperatury		Trocken aufbewahren / Store in a dry place / Conserver au sec / Mantener seco / Op een droge plaats bewaren / Mantener asciutto / Przechowywać w suchym miejscu
	Gebrauchsanweisung beachten / Please read instructions for use / Respecter les instructions d'utilisation / Obsérvense las instrucciones de uso / Lees de bijsluiting / Consultare le istru- zioni per l'uso / Przestrzegać instrukcję użycia		Packung geschlossen halten / Keep container closed / Refermer la boîte / Mantenga el envase cerrado / Verpak- king gesloten houden / Conservare la confezione chiusa / Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty
	Ausreichend für <n> Prüfungen / Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Contenido suficiente para <n> tests / Voldoende voor <n> tests / Contenido sufficiente per <n> test / Wystarczająco dla kontroli <n>		

Fuente: <https://n9.cl/uav8b>

Anexo 10: Inserto P30



Abacus Diagnostics, Inc.

ABAcad_® p30 Test For The Forensic Identification of Semen

For Forensic Use

Immunoassay for the qualitative detection of p30 for the forensic identification of semen.

Catalog # 308332 (25 Test/kit)

Technical Information sheet

Intended Use

ABAcad_® p30 test is designed to qualitatively detect p30 for the forensic identification of semen. p30 is an accepted marker for detecting semen in criminal cases including vasectomized or azospermic individuals.

Summary

In 1971 Hara et al. first described a protein in the seminal fluid, named gamma-seminoprotein. In 1978, Sensabaugh et al. characterized the protein in detail, found that its molecular weight corresponds to 30,000 Dalton and named it p30. In 1980 first immunometric assays were developed and Graves and Sensabaugh demonstrated that p30 is a reliable forensic marker for the identification of semen. The range of p30 is 200,000 to 5.5 million nanogram per ml of semen. The sensitivity of ABAcad_® p30 test is 4 ng/ml and therefore seminal fluid diluted up to 1 in a million should also be detectable. Various methods of detection of p30 include Ouchterlony double diffusion, crossover electrophoresis, rocket immunoelectrophoresis, radial immunodiffusion, and ELISA. A disadvantage of all the above conventional methods is that they are either not sensitive enough or cumbersome and time consuming to perform in forensic laboratories. Abacus Diagnostics's ABAcad_® p30 is, however, very sensitive with results only within 10 minutes.

Principle Behind This Test

In this test procedure, 200 µl of sample is added to the sample well 'S', and allowed to soak in. If p30 is present in the semen specimen, it will react with the mobile monoclonal antihuman p30 antibody and a mobile antigen antibody complex is thus formed. This mobile antibody-antigen complex migrates through the absorbent device towards the test area 'T'. In the test area 'T', a monoclonal antihuman p30 antibody is immobilized. This immobilized antibody captures the above complex so that an antibody-antigen-antibody sandwich is formed. The conjugated pink dye particles concentrate in a narrow zone on the membrane. When the p30 concentration in the sample exceeds 4 ng/ml the pink dye particles will form a pink colored band in the test area 'T' indicating a positive test result. As an internal positive control, p30 antibody-dye conjugates cannot bind to the antibody in the test area 'T', but are captured by an immobilized anti immunoglobulin antibody present in the control area 'C' forming a complex. The captured pink dye particles will thus form a band in the control area 'C', indicating that the test has worked properly and proper procedures have been followed. Thus, presence of two colored lines, one in the test area 'T' and other in the control area 'C', indicates a positive result, while a line only in the control area 'C' would indicate a negative result (provided no "high dose hook effect").

Reagents And Materials Provided

1. Test Device (25 pcs, each sealed individually in a test pouch)
2. A Dropper and a desiccant sealed inside each of the test pouch.
3. Test Instructions

Materials Required But Not Included

1. Clock or timer.
2. Centrifuge

Stability, Storage and Shelf Life

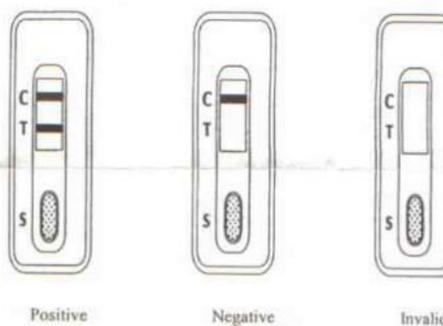
ABAcad_® p30 Detection Test should be stored below 82°F (28°C). The test can be stored in the sealed pouch below 82°F (28°C) until the expiration date as printed on the sealed test pouch. Do not Freeze. Do not use the test after the

Sample Collection, Preparation and Storage

- The frozen specimens/swabs/stains must be thawed completely and brought to 2-8 °C.
- Extraction of specimens from swab or stain may be performed in 750 µL of HEPES buffered saline for 2 hours at 2-8 °C. Distilled water or other buffers suitable for further DNA extraction may be used as well. This procedure recovers approximately 99% of the extractable p30 on the swab.
- Centrifuge the above sample for 3 minutes after the above extraction step. Remove 300 µl of supernatant for testing purposes. This aliquot may be stored between 2-8 °C if not used immediately. Immediately before use with ABAcad_® p30 test, the sample should be brought back to room temperature. Remaining sample may be used for further DNA analysis without affecting the DNA yield.

Test Protocol

1. Allow the sample to warm to room temperature if it has been refrigerated.
2. Remove the device and the dropper from the sealed pouch.
3. Label the device with the case number.
4. Add 200 µL (or 8 drops with the dropper) of sample to the sample well 'S' of the test device.
5. Read result at 10 minutes. Positive results can be seen as early as 1 minute depending upon the p30 concentration. For negative results, one must wait for full 10 minutes.



1. **Positive.** If there are two pink lines, one each in the test area 'T' and in the control area 'C', the test result is positive and indicates that the p30 level is at or above 4 ng/ml.
2. **Negative.** If there is only one pink line (in the control area 'C'), the test result is Negative. This may indicate that (a) No p30 is present above 4 ng/ml or (b) Presence of "High Dose Hook Effect". Presence of "High Dose Hook Effect" may give false negative result due to the presence of high concentration of p30 in the sample, as for example in undiluted seminal fluid. In such cases the sample may be retested using a 10 to 10,000 fold dilution.
3. **Invalid.** If there is no pink line visible in the control area 'C', the test is inconclusive. Repeat the test and reexamine the test procedure carefully.

PRECAUTIONS

- For the in vitro qualitative detection of p30 for the forensic identification of semen only.
- Do not use beyond the expiration date which appears on the sealed pouch.
- Disposable gloves should be worn while handling kit reagents or specimens. Wash your hands after the test.
- A fresh transfer pipette for each specimen should be used.
- Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are being handled.

Fuente: <https://n9.cl/xi2cn>

Anexo 11: Técnica de Christmas tree o Árbol de Navidad

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

OBSERVACION

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.

Anexo: Instructivo para preparación de colorantes usados en la tinción

Fuente: <https://www.cienciasforenses.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/registro-oficial-318-MANUALES-PROTOCOLOS.pdf>