



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**TIPOS DE SOPORTE Y SU INFLUENCIA SOBRE LAS VARIACIONES EN LA  
MORFOLOGÍA Y TIEMPO DE PERMANENCIA DE ESPERMATOZOIDES EN MUESTRAS  
FORENSES, PNP, 2021 – 2022**

**Línea de investigación:**

**Genética, Bioquímica y Biotecnología**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**

Sarmiento Bergamino, Andrea Romelia

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

López Bulnes, Jorge Luis

Riveros Ramirez, Maribel Denise

Rodrigo Rojas, María Elena

**LIMA – PERÚ**

**2023**

## **DEDICATORIA**

Mi tesis la dedico con toda la gratitud a Jehová por darme un día más de vida y regalarme una nueva oportunidad de crecer en todo aspecto. Con mucho cariño principalmente a mis padres por darme la vida y estar conmigo en todo momento, a mi padre contribuyendo a lograr mis metas y objetivos propuestos; a mi madre que me acompañó a lo largo de toda la carrera dándome fuerzas para continuar y momentos de ánimo, por lo cual estoy muy agradecida mamá. A mi hermana que me acompañó de manera incondicional, entendiendo mis ausencias y malos momentos por el estímulo. A mi Asesor y Profesor de uno de mis cursos favoritos por siempre apoyarme en todo este proceso y quizás jalones de orejas; también quiero dedicársela a todos en la entidad de la DIRINCRI por apoyarme y aconsejarme y poder aprender de ellos. A mi mejor amiga y mejor amigo quienes me brindaron su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Jehová por ayudarme a cumplir mis metas de mi realización de manera profesional y por siempre cuidarme.

A cada uno de los biólogos peritos forenses de unidad de Criminalística de la DIRINCRI, que compartieron sus conocimientos, experiencia y apoyo para poder realizar este trabajo, en especial al Comandante Carlos Domínguez, por permitirme y apoyarme en este trabajo y parte de vivir lo que me gustaría especializarme.

También agradezco a la Universidad por ser una segunda casa, a todos mis profesores que fueron parte de mi enseñanza y formación profesional.

## INDICE

RESUMEN .....	7
ABSTRACT.....	8
I.INTRODUCCIÓN.....	9
I.1.Descripción y Formulación del Problema .....	9
I.2.Antecedentes .....	11
I.3.Objetivos .....	14
I.4. Justificación.....	14
I.5. Hipótesis.....	17
II.MARCO TEÓRICO .....	18
2.1. Violencia Sexual .....	18
2.2. Composición del Semen.....	18
2.3. Caracteres Macroscópicos del Semen .....	19
2.4. Degradación del Semen .....	20
2.5. Técnicas de Tinción .....	21
2.6. Factores que Influyen en la Recuperación del Semen.....	22
2.7. Tiempo de Permanencia de los Restos Seminales.....	22
2.8. Prendas Textiles .....	23
III. MÉTODO .....	24
3.1. Tipo de Investigación .....	24
3.2. Ámbito Temporal y Espacial.....	24
3.3. Variables.....	25
3.4. Población y Muestra .....	25
3.5. Instrumentos.....	26
3.6. Procedimientos .....	26
3.7. Análisis de datos .....	34
IV. RESULTADOS.....	35
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
VI. CONCLUSIONES.....	49
VII. RECOMENDACIONES.....	50
VIII. REFERENCIAS .....	52

IX.ANEXOS..... 60

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1 :</b> Factores de degradación del semen .....	20
<b>Tabla 2 :</b> Resultados obtenidos de espermatozoides para las muestras de semen con la Coloración de Christmas Tree y Hemaxotilina- Eosina .....	36
<b>Tabla 3 :</b> Resultados obtenidos de espermatozoides para las muestras de semen y orina con la Coloración de Christmas Tree y Hemaxotilina- Eosina .....	37
<b>Tabla 4 :</b> Porcentaje de las formas completas e incompletas de espermatozoides según el tipo de soporte.....	41
<b>Tabla 5 :</b> Formas completas e incompletas de espermatozoides según el tipo de permanencia..	42
<b>Tabla 6 :</b> Ventajas y Desventajas de técnicas Christmas Tree y Hemaxotilina- Eosina para visualización microscópica de espermatozoides.....	45

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Búsqueda de evidencia en la escena del crimen .....	31
<b>Figura 2:</b> Recojo de evidencia y rotulado .....	32
<b>Figura 3:</b> Acta de descripción de la muestra.....	33
<b>Figura 4:</b> Análisis de muestra en el Laboratorio de Biología Forense .....	34
<b>Figura 5:</b> Observación al microscopio de muestras de semen (A y B) y de orina (C y D) coloreadas con la técnica Christmas Tree (A y C) y Hemaxotilina Eosina (B y D). Fuente: Foto tomada en la DIRINCRI .....	38
<b>Figura 6:</b> Distribución de material de soporte en diferentes muestras durante el periodo de estudio .....	40
<b>Figura 7:</b> Distribución de la descripción de la muestra en el periodo de estudio .....	41

## RESUMEN

La investigación del fluido seminal en prendas interiores de víctimas es muy frecuente en nuestro país por parte del Laboratorio de Biología Forense. El estudio de evidencias es importante como muestra circunstancial del hecho por lo que se realizó el presente estudio a fin de poder utilizar estos datos como un indicador del tiempo de permanencia de espermatozoides en manchas seminales y probabilidad de encontrar espermatozoides con morfología completa. Se trabajó con muestras llegadas al laboratorio y recogidas en escena de mujeres víctimas de delitos contra la libertad sexual, tomando en cuenta las horas transcurridas desde el momento de los hechos de violación, para determinar las variaciones morfológicas de los espermatozoides observados con dos técnicas de coloración y determinación del tiempo de permanencia en el análisis de laboratorio para los tipos de soportes forenses con fines de aplicación en la biología forense. Los resultados muestran que la coloración Christmas Tree permite una mejor diferenciación de espermatozoides, sean completos o incompletos, incluso a mayor tiempo de antigüedad que la coloración con Hematoxilina-Eosina. También se ha observado en mayor proporción espermatozoides completos en muestras de látex que en algodón u otro material.

***Palabras clave:*** Espermatozoides, Christmas Tree, soportes forenses



## ABSTRACT

The investigation of seminal fluid in victim's undergarments is very frequent in our country by the Forensic Biology Laboratory. The study of evidence is important as a circumstantial sample of the event; so this work has been done in order to be able to use this data as an indicator of the permanence time of spermatozoa in seminal stains and the probability of finding spermatozoa with complete morphology. Work was carried out with samples that arrived at the laboratory and were collected at the scene from female victims of crimes against sexual freedom, taking into account the hours that had elapsed since the time of the rape, in order to determine the morphological variations of the spermatozoa observed using two staining techniques and to determine the time of permanence in the laboratory analysis for the types of forensic supports for the purposes of application in forensic biology. Results show that Christmas Tree technique was better than Hematoxilyn-Eosin to visualize complete and incomplete sperm cells, including in longer permanence time in the samples. Also, it has been observed more frequency of complete sperm cells in latex material than others, for example in cotton clothing.

**Keywords:** Spermatozoa, Christmas Tree, forensic carriers.

## I.INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de Biología Forense de la Dirección de Investigación Criminal de la Policía Nacional del Perú llegan muestras relacionadas a los delitos en contra de la Libertad Sexual. En este tipo de muestras, es investigada la presencia de manchas de semen en distintos tipos de soportes (medio de difusión o sostenimiento), a distintas cantidades y muchas veces con abundante contaminación bacteriana (Arroyo-Sánchez, 2016).

En la actualidad, la investigación forense de delitos de libertad sexual está asociada directamente con el hallazgo de espermatozoides y su relación con el tiempo de permanencia en el laboratorio de la Biología forense; debido a un mayor tiempo de la demora para el análisis de las prendas de las víctimas, o las mismas víctimas como también los posibles acusados de violación contra la libertad sexual pasando por el laboratorio para recaudar muestra de resto seminal, puede ocasionar cambios en la morfología de los espermatozoides y en algunas situaciones, degradación completa.

### **I.1.Descripción y Formulación del Problema**

En la actualidad para la visualización, diferenciación e identificación morfológica de espermatozoides humanos se trabaja con coloración hematoxilina-Eosina (Lingappa et al., 2015). En muchos casos la observación al microscopio es dificultosa debido a sangre menstrual, orina y fluido vaginal o por una mala conservación de ésta. Y, es necesario que se permita mejorar la visualización de la estructura del espermatozoide y de otras células examinadas al microscopio de las muestras trabajadas.

En la espermatología forense, se utilizan pruebas de certeza y orientación tales como: inmunocromatográfica y determinación de fosfatasa ácida en las aparentes manchas seminales de los diferentes soportes. Estos resultados preliminares deben ser confirmados con la prueba de certeza como: observación microscópica de espermatozoides (PNP, 2012) usando una coloración Christmas Tree, técnica utilizada a nivel nacional e internacional y con gran acogida. (Frías et al., 2019)

En el laboratorio de Biología Forense de la Dirección de Investigación Criminal PNP llegan muestras relacionadas con delitos en contra de la Libertad Sexual y se efectúa las pericias biológicas de diferentes indicios remitidos, siendo las manchas de semen halladas en prendas con mayor frecuencia que se reciben y es evidente que el tiempo en la demora de llegada de la evidencia por la cadena de custodia, como el estado de preservación, influye en la búsqueda de los elementos del semen y muchas veces con abundante contaminación bacteriana (Arroyo-Sánchez, 2016). Esquivas (2018) en la ciudad de Arequipa realizó un trabajo en el cual hizo un experimento preparando muestras acondicionadas lo más cercano posible a muestras reales tal y como llegan al laboratorio de Biología Forense, usando sólo dos soportes (algodón y sintético). Este autor utilizó la técnica de coloración Gram, con la que obtuvo un mayor número de muestras incompletas, quizá debido a que dicha coloración no es específica para espermatozoides.

Por lo expuesto, el presente proyecto busca profundizar la determinación de las variaciones morfológicas de los espermatozoides encontrados en prendas de la víctima, material de látex, diferentes tipos de tela y en hisopos de algodón utilizados para toma de muestra de restos de semen

y según el transcurso del tiempo utilizando la técnica Christmas Tree especial para la visualización de los espermatozoides, sobre todos los soportes de interés forense mencionados, que son remitidas totalmente lacrados respecto a la identificación de espermatozoides y así contribuir con información en la investigación de un delito contra la libertad sexual.

## **I.2. Antecedentes**

El reconocimiento de fluido seminal constituye a un viejo problema en Criminalística. Olliver y Barruel en el año 1826 publicaron sobre un caso de ataque sexual donde se presumían que ciertas manchas en la ropa de la víctima fueron hechas intencionalmente con grasa de origen animal. Los expertos observaron las ropas con respecto a su solubilidad en agua, naturaleza, color y conducta en alcohol absoluto. Ambos autores concluyeron que la mancha era de semen. En aquella época los investigadores se orientaban solo por estos parámetros. (Vega-Vega et al., 2014), La toma de las muestras, con el consentimiento informado de la víctima, debe tener en cuenta las características y circunstancias en que ocurrieron los hechos y el tiempo transcurrido.

Devergie en el año 1839, reveló un proyecto, el cual había observado células de esperma en manchas seminales de 10 meses, y certificó que la confirmación de la presencia de espermatozoides en una mancha era un fundamento más cierto para el diagnóstico de manchas seminales que los métodos químicos. El estudio de manchas de semen tiene gran importancia en criminalística, ya que constituye una prueba precisa y está asociada a crímenes de índole sexual. (López, 2013)

En un delito de violación sexual, el semen es lo más habitual y puede hallarse en las víctimas, así como el desecado, conformado por manchas, ya que los indicios con más continuidad se hallan en las escenas y son remitidas al laboratorio en la investigación de estos delitos con las prendas de vestir y de cama de la víctima, del acusado o de ambos, o los sospechosos de haber cometido el ultraje. (López, 1953)

Prieto (2009), en su “Estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de biología forense” realizado en el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Departamento de Sevilla, señalaron que se logran localizar en personas vivas y de forma frecuente en un tiempo máximo de 7 días cabezas de espermatozoides en una vagina, dos o tres días en el recto y 24 horas en boca; además sustenta que es natural examinar espermatozoides intactos (con cola) en vagina dentro de las 24 horas siguientes del acto sexual, pero rara vez se encuentran en boca, recto tras las 5 horas de los hechos.

Davies y Wilson (2010) retribuyeron en base a un estudio de persistencia de restos seminales en una vagina humana realizado en el Laboratorio de Ciencias Forenses de la Policía que los espermatozoides fueron hallados hasta el cuarto día y rara vez hasta el sexto día.

El elemento central en la tipificación del semen es el descubrimiento del espermatozoide, compuesto por cabeza, pieza medial y cola. La cabeza muestra forma ovalada de frente y piriforme de perfil; mide de 4  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$  de longitud y 2.5  $\mu\text{m}$  a 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho. La pieza medial es una región cilíndrica estrecha, de 5  $\mu\text{m}$  de longitud, y contiene la carga mitocondrial que provee el ATP para la movilidad del espermatozoide. La cola es una estructura importante para el transporte

del espermatozoide. Tiene una longitud de 40  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ , desenrollada y homogéneo. (World Health Organization [WHO], 2010).

El esperma debe ser teñido para una mejor evaluación de la morfología (Quispe-Mayta et al., 2010). Las características morfológicas de los espermatozoides se expresan en valores numéricos. Los métodos utilizados en la coloración pueden causar un ligero cambio en los valores de medición de los espermatozoides porque los fijadores pueden hacer que las células se encojan un poco.

Ante la alta frecuencia de muestras clasificadas como presuntivas, es un desafío buscar métodos verídicos que permitan confirmar la presencia de cabezas de espermatozoides, dado que el hallazgo certero de cabezas permite confirmar la presencia de semen y además en las cabezas se encuentra el ADN, permitiendo la identificación del agresor. Por otra parte, el no hallazgo de espermatozoides en la muestra puede deberse a que el agresor es azoospérmico o puede haber utilizado preservativo, en que el resultado puede dar negativo (López, 2013; Turvey, 2014).

Esquivas (2018) realizó su Tesis “Estudio De Las Variaciones Morfológicas Y Tiempo De Permanencia De Los Espermatozoides Impregnados En Dos Tipos De Soporte Sometidos Al Efecto De *Escherichia Coli*, con fines en la Investigación Forense, Arequipa, 2018” en el cual se realizó con muestras no reales (creadas por el autor), utilizando la coloración Gram, donde comparó una mayor recuperación de espermatozoides en dos soportes (algodón y sintético) sometidos al efecto de *Echericha coli*, obteniendo como resultados que, en ambos soportes hubo

mayor recuperación de espermatozoides incompletos en el transcurso de 6 horas para el soporte sintético y a las 12 horas para el soporte de algodón.

### **I.3.Objetivos**

- **Objetivo General**

Determinar la influencia de los tipos de soporte sobre las variaciones morfológicas y el tiempo de permanencia de espermatozoides en muestras forenses.

- **Objetivos Específicos**

- ❖ Evaluar la influencia de los tipos de soporte sobre las variaciones morfológicas.
- ❖ Evaluar la influencia de los tipos de soporte sobre el tiempo de permanencia de espermatozoides.

### **I.4. Justificación**

En el área de la biología forense es sustancial rastrear la evidencia y tomar muestras de material biológico para documentar el presunto contacto sexual o físico, así como corroborar el relato de la víctima y el presunto agresor, para obtener la información que resulte útil en la resolución del proceso legal. Dentro de la evidencia que se debe tomar temprano, está la ropa íntima de la víctima, muestras de la cavidad oral en los casos donde se haya referido sexo oral como parte del ataque, muestras de las manos y uñas, así como muestras de piel (Arroyo, 2016).

El semen es una prueba crucial para algunos delitos sexuales, y su confirmación sería la identificación de espermatozoides. El éxito de la determinación de espermatozoides, la observación de un frotis en una lámina sería una prueba de ello (Suttipasit,2019). Existen distintas coloraciones empleadas para colorear espermatozoides en el área forense, la coloración de Christmas Tree es una de las más difundidas y aceptadas por la comunidad científica forense (Frías et al., 2019).

La fosfatasa ácida prostática (FAP), es compendiada por la glándula prostática y secretada en el semen durante la eyaculación. La actividad de FAP está intensificada en el fluido seminal y es detectable aun en muestras sometidas a condiciones contraproducente, como la exposición a temperaturas elevadas; su precisión es un recurso acoplable a la búsqueda de semen, obteniendo importancia como marcador forense en casos de muestras azoospermicas (ausencia de espermatozoides) u oligozoospermicas (concentración espermática menor a 15 millones por mL de semen) (Pavesi et al., 2008).

La Organización Mundial de la Salud ha desarrollado un manual de laboratorio para el examen espermatogénico, en el cual se sugiere el uso de los métodos de coloraciones de Christmas Tree, Shorr, Hematoxilina-Eosina y se establecen estrictos criterios para determinar la morfología de los espermatozoides (Triana y Sánchez, 2015).

Cisneros y Villarroel (2016) indicaron que la visualización microscópica de espermatozoides sigue siendo considerada la prueba definitiva en los laboratorios de biología forense y que coloración Christmas Tree se utiliza como coloración identificativa de células



espermáticas, debido a que los métodos se caracterizan por discernir principalmente espermatozoides completos o incompletos, células epiteliales, que regularmente están presentes en las muestras procedentes de una agresión sexual. Se demostró ser sencillo y efectiva la coloración de Christmas Tree y de un costo capaz de aumentar la sensibilidad de confirmar la azoospermia (Monteiro y Hallak, 2016).

La coloración Christmas Tree es específica para espermatozoides, el material nuclear se colorea de color rojo/púrpura, el cuerpo de los espermatozoides se visualiza de forma ovalada y coloreado de rojo/fucsia con un fondo rosado leve, el acrosoma del espermatozoide se colorea de color rojo leve, la región media y la cola de los espermatozoides se colorean de color verde o azul verdoso (Atieza y Martínez, 2010).

La importancia de esta investigación sustenta su motivación, en conocer el tiempo en el que se pueden localizar espermatozoides en tipos de soportes de interés forense; prendas de víctimas de violación sexual y se contribuya con información de referencia en los análisis de las evidencias de diferentes expedientes de las muestras incriminadas que son remitidos al Laboratorio de Biología Forense de la UNICRI-DIRINCRI.

Por lo expuesto, se formuló como propósito de estudio la investigación de las variaciones morfológicas de los espermatozoides conforme a el tiempo de permanencia en los tipos de soportes (medio de difusión o sostenimiento), con fines de aplicación en la investigación forense.

## **I.5. Hipótesis**

Debido a que se trata de un trabajo de tipo descriptivo, no se ha considerado el planteamiento de una hipótesis.

## II.MARCO TEÓRICO

### 2.1. Violencia Sexual

#### 2.1.1. Definición de Violencia Sexual

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010) establece como Violencia Sexual “Todo acto sexual, la incitación de consumir un acto sexual, las provocaciones sexuales no deseadas o los hechos para aplicar de cualquier otra forma la sexualidad de una persona mediante coacción por otra persona, indispensablemente de la relación de ésta con la víctima, en ámbitos como: el hogar, lugares de estudios y el trabajo”.

#### 2.1.2. *Violación Sexual*

El artículo 170° del CÓDIGO PENAL del año 1991 (pág. 154) determina el término de violador sexual a aquel que “con violencia o grave amenaza, obliga a una persona a practicar el acto sexual u otro análogo”.

### 2.2. Composición del Semen

Se denomina semen o líquido seminal, al producto de la secreción del aparato genital masculino, cuya función específica estriba en la fecundación. Menos del 10% del volumen total del semen corresponde a los espermatozoides, el otro 90% al líquido seminal. (Stuart, 2005) Contiene ácido cítrico, aminoácidos libres, fructosa, enzimas, fosforilcolina, prostaglandina, vitamina b12, vitamina C, potasio y zinc (Carma, 2010).

#### 2.2.1. *Morfología del Espermatozoide*

Es la célula reproductora masculina. Esta célula es de forma piramidal, son las únicas células del ser humano que poseen flagelo, que da movilidad a la misma se compone de dos partes principales que son cabeza y cola de las cuales se distinguen las siguientes estructuras que son siguientes: acrosoma, núcleo, membrana, cuello, cola. El espermatozoide humano maduro mide 60  $\mu\text{m}$  de largo y es una célula de movimiento activo. (Toro, 2009)

### **2.2.2. Cabeza del Espermatozoide.**

Esta estructura contiene dos partes principales que son el acrosoma, este cubre los dos tercios anteriores de la cabeza, y el núcleo que contiene los 23 cromosomas que se unirán al óvulo completando la información genética. La cabeza mide 5  $\mu\text{m}$ , el núcleo y el acrosoma están envueltos en una membrana plasmática que sirve de unión entre cabeza y cola (Del Río et al., 2007).

### **2.2.3. Cola.**

Conocido como flagelo, aquí se halla el cuello que es corto, grueso incluye residuos citoplasmáticos de la espermática. Luego del cuello hallamos la pieza media mide de 4 o 5  $\mu\text{m}$ , la cual proporciona movilidad a la célula. (Cuiza, 2016)

## **2.3. Caracteres Macroscópicos del Semen**

### **2.3.1. Color y Aspecto.**

En la condición fresca se observa como un líquido filante, blanco lechoso, tenuemente amarillento, que al secarse se forma amarillo franco y de aspecto acartonado. Colocado en una

lámina tiene el aspecto heterogéneo, pequeños grumos, opaco, haciéndose transparente. (Pello y Ramírez, 2010)

### 2.3.2. Olor

*Sui generis*, que en la especie humana recuerda al castaño comestible o al desmanche (lejía). Su intensidad depende del tiempo de abstinencia que tiene la persona. (Pello y Ramírez, 2010)

## 2.4. Degradación del Semen

La mortalidad espermática es un proceso de evolución decreciente marcado en las víctimas que en las evidencias. Está afectado por factores biológicos, físicos, químicos y mecánicos (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Factores de degradación del semen (tomado Esquivias, 2018).*

<b>FACTORES DE DEGRADACIÓN</b>	<b>PROCESOS DE DESINTEGRACIÓN</b>
Biológico	Efecto enzimático del espermatozoide Flora bacteriana de la víctima
Físico	Variaciones de temperatura Porcentaje de humedad Progreso del tiempo
Químico	Aplicación de detergentes Aplicación de cremas en las víctimas
Mecánico	Limpieza Lavado Baños

## **2.5. Técnicas de Tinción**

La tinción es un procedimiento por el cual las moléculas de un colorante se succionan a una superficie. El uso de colorantes permite modificar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la identificación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo.

Las técnicas de coloración son auxiliares de diagnóstico confirmatorio dentro del estudio microscópico, dando mayor visualización a las estructuras analizadas para su posterior identificación, de las cuales podemos diferenciar con mayor facilidad. Las diferentes técnicas de coloración no solo nos permiten ver células, sino que también se han teñido estructuras relativamente más grandes como tejidos (Megias et al., 2019).

Las técnicas de tinción para los espermatozoides son variadas, describiremos las técnicas que utilizaremos:

### ***2.5.1. Tinción de Christmas Tree.***

La técnica de Christmas Tree o árbol de navidad para la identificación de espermatozoides. Este método forense está fundamentado en la coloración nuclear de alto contraste, específico para el núcleo del espermatozoide. La composición de los reactivos: Reactivo Rápido Rojo Nuclear o de Kernechtrot (Rojo Rápido Nuclear 100 g + Sulfato de Aluminio 5 g + Agua Destilada 100 ml) y Pícrico Índigo Carmín (Ácido Pícrico 300ml + Índigo Carmín 1g), (Narváez, 2016).

Existen diferentes tinciones utilizadas para teñir espermatozoides en el área forense, la tinción de Christmas Tree, esta tinción utiliza los colorantes rojo rápido nuclear y picro índigo carmín. La cabeza se tiñe de color fucsia a rojo, la cola se teñirá de una coloración verde. También se tiñen las células epiteliales presentes, observándose como estructuras romboides con núcleos de color rosado (Wheeler y Wilson, 2008).

## **2.6. Factores que Influyen en la Recuperación del Semen.**

Se considera a la ausencia de restos del líquido seminal, obedecen a una característica fisiológica propia del agresor, debido a una disfunción o procedimiento de intervención quirúrgica como la vasectomía. Además, está asociado a otros factores como: - Empleo de preservativo por parte del agresor - Elaboración de lavados vaginales, anales o bucales en la víctima - Degradación del líquido seminal, por efecto de las enzimas, pH y flora bacteriana (Esquivias,2018).

## **2.7. Tiempo de Permanencia de los Restos Seminales.**

En el estudio presentado por el Instituto de Medicina Legal del Ministerio Público, (Carreño,2009, diap. 26), relata intervalos de tiempo máximo reportados para alejamiento de espermatozoides.

Según (Ruiz, 2004, pág. 6), el tiempo de supervivencia de los espermatozoides y otros componentes seminales en cavidades naturales y prendas, está influenciado por una gran mutabilidad de factores físicos, químicos y biológicos.

## **2.8. Prendas Textiles**

### ***2.8.1. Estructura y Composición de Fibras Textiles.***

El término 'fibras textiles' se relaciona a las que se pueden hilar para fabricar telas por medio de operaciones como tejido, trenzado. El tejido, una actividad artesanal, ya se ejercitaba en el neolítico, como lo demuestran los fragmentos de fibras de lino hallados en los restos de poblados lacustres de Suiza. En el antiguo Egipto los primeros textiles se tejían con lino; Perú y Camboya con algodón; en Europa meridional con lana y en China con seda.

### ***2.8.2. Clasificación de Prenda.***

La distribución de las fibras textiles se realiza por diferentes criterios, pero conforme a el origen, se dividen en dos grandes grupos: Fibras naturales, y Fibras artificiales.

Fibras naturales: material de Algodón

Fibras artificiales: material Sintética



## III. MÉTODO

### 3.1. Tipo de Investigación

Para la realización del presente trabajo se usó tres tipos de investigación de acuerdo con los objetivos planteados:

#### 3.1.1. *Cuantitativa.*

Se ha obtenido información que es analizada e interpretada, para a partir de ello obtener un estudio profundo mediante datos estadísticos sobre los distintos soportes de las muestras trabajadas.

#### 3.1.2. *Experimental.*

Se experimentará con una técnica utilizada (Christmas Tree) para la identificación de espermatozoides basada en los principios del método científico, con la intención de obtener resultados que permitan valorar su efectividad.

#### 3.1.3. *Comparativo.*

Permite comparar una técnica con un estándar al ser utilizadas para un mismo fin, en este caso la Técnica de Christmas Tree probada (experimental) y de esta manera contrastar resultados.

### 3.2. Ámbito Temporal y Espacial

#### 3.2.1. *Temporal.*

La investigación se llevará a cabo en los meses de abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre, diciembre del 2021 y los primeros meses del 2022.

### **3.2.2. Espacial.**

El laboratorio de Biología Forense en la Unidad de Criminalística se realizó en la Dirección de Investigación Criminal (DIRINCRI), en la sede de la Av. España 323, Cercado de Lima 15001.

## **3.3. Variables**

### **3.3.1. Variable Dependiente.**

- Variaciones morfológicas
- Tiempo de Permanencia de espermatozoides

### **3.3.2. Variable Independiente.**

- Tipos de soportes

### **3.3.3. Matriz de consistencia (ver Anexos)**

## **3.4. Población y Muestra**

En la presente investigación, se considerará como muestra: el espermatozoide completo o incompleto, observado en un campo de microscopio óptico a 1000x, procesado desde la impregnación en un soporte de fibra de algodón, fibra sintética y látex, sometido al efecto de la tinción Christmas Tree, según el transcurso del tiempo y que cumplió con los criterios de selección. La muestra de semen para la obtención de espermatozoides, se obtendrán de muestras remitidas al laboratorio.

### **3.5.Instrumentos**

#### **3.5.1. *Materiales de Laboratorio.***

Se usarán Lámina portaobjetos, baguetas, tubos de ensayos, pipetas, vaso precipitado.

#### **3.5.2. *Equipos.***

Se emplearán Centrifuga (CLAY ADAMS Brand), microscopio óptico, balanza analítica (Denver Instrument Company), refrigeradora, computadora (HP) y cámara (Samsung).

#### **3.5.3. *Reactivos y diluyente.***

Se emplearán Reactivo Kernechtrot (500 ml), Reactivo Picro ÍndigoCarmin (100 ml), alcohol (96°C), aceite de inmersión, agua destilada y suero fisiológico.

### **3.6.Procedimientos**

Se realizará la metodología de investigación en laboratorio del área de la Unidad de Criminalística (UNICRI) de Biología Forense bajo la normativa de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH).

#### **3.6.1. *Obtención de la muestra.***

El trabajo de investigación se realizará en la Dirección de Investigación Criminal (DIRINCRI), en la sede de la Av. España. Las muestras serán obtenidas de diferentes Departamento de Investigación Criminal (DEPINCRI), procedentes de mujeres violadas o de escenas de crimen recolectadas y llevadas al laboratorio.

#### **3.6.2. *Técnicas para obtención de espermatozoides en soportes.***

En el manual de procedimientos del Laboratorio de Biología Forense (Fiscalía General del Estado de Ecuador, 2016), se describen los pasos para realizar la obtención de muestra en soporte sólido para recuperar espermatozoides.

1. En el soporte sólido (algodón y sintético), se realiza un corte de 1 cm<sup>2</sup> y se coloca en un tubo de ensayo.
2. Agregar 200 ul de suero fisiológico estéril
3. Agitar con un dispositivo Vortex por 30 minutos a mínima rpm.
4. Centrifugar el tubo de ensayo con la muestra del soporte por 5 minutos a 3.600rpm.
5. Eliminar el sobrenadante con una pipeta.
6. Transferir el sedimento a una lámina porta objetos.
7. Proceder a fijar la lámina.
8. Finalmente se realiza la tinción de Christmas Tree.
9. En el caso de muestras de preservativos (látex) se obtiene la muestra directamente de semen, y se procede con los pasos 6, 7 y 8.

#### ***3.6.2.1. Técnica de Christmas Tree Protocol.***

1. Visualizar en la lámina donde se encuentra el frotis.
2. Adherir el frotis a calor seco o exponerlo a la llama directamente.
3. Colocar unas dos gotas (que cubra el frotis) de la solución Kernechtrot y dejar durante 20 min.
4. Lavar con agua destilada.

5. Colocar unas cuantas gotas (que cubra el frotis) de la solución Picroíndigocarmine y dejar actuar con el tiempo correspondiente a 1 minuto.
6. Aclarar el frotis con etanol al 96 % lavando la placa.
7. Dejar secar y montar la placa.
8. Observar en lente 100 X, con aceite de inmersión.

### ***3.6.3. Técnica para la Determinación de Variación Morfológica.***

Con el objetivo de visualizar espermatozoides coloreados, las láminas con sedimento recuperado de semen impregnado en los soportes se colorearán con Christmas Tree para la diferenciación de bacterias y descartar posible contaminación oportunista. Las variaciones morfológicas de los espermatozoides se evaluarán mediante observación en microscopio óptico a 1000 aumentos (microscopio Leica, Departamento Biología Forense - División de Criminalística – PNP Perú) y se capturarán fotografías en tiempo real de las láminas. Se seleccionará al azar 3 campos y se realizaran el recuento de acuerdo al siguiente criterio de clasificación según los tiempos de evaluación:

- Espermatozoide completo: presencia de cabeza, segmento intercalar y cola
- Espermatozoide incompleto: presencia de sólo cabeza

### ***Preparación de las muestras***

Se utilizaron como soporte físico dos pedazos de tela de algodón de 10 x 10 cm a los cuales se les impregnó con dos volúmenes de semen, 1 ml en uno y 1,5 ml en otro. Luego, se recortaron ambos pedazos en una tira de 2 x 1,5 cm, la cual fue colocada en un tubo de ensayo con 1,5 ml de suero fisiológico, para luego centrifugar los tubos a 2500 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante

y de la suspensión residual (sedimento) se tomaron dos gotas, las cuales fueron colocadas en dos láminas portaobjetos diferentes. A una de estas láminas se coloreó con la técnica de Hematoxilina-Eosina y a la otra con la técnica de Christmas Tree para luego realizar la observación al microscopio compuesto. El resto de los pedazos de tela fueron almacenados a temperatura ambiental, para cortar retazos de 2 x 1,5 cm y repetir el procedimiento a la semana y a los 15 días. Se prepararon otra serie de láminas según el mismo procedimiento, con la salvedad que la muestra estaba compuesta por una mezcla de semen y orina en proporción 1:1.

#### ***Protocolo para la Técnica de Hematoxilina-Eosina.***

En las láminas donde se colocaron las gotas de muestra, se colocaron unas gotas de Hematoxilina, de manera que cubra toda la superficie. Se dejó actuar el colorante por 3 minutos, luego de los cuales se colocaron unas gotas de Eosina, de la misma manera para cubrir toda la lámina. Se dejó en reposo por 30 segundos y se lavó con agua destilada. Se dejó secar y se realizó la observación al microscopio compuesto con objetivo 100 X.

#### ***Técnica de Christmas Tree.***

Se fijaron las láminas a calor seco o por exposición a la llama directa. Se colocaron unas dos gotas de la solución Kernechtrot hasta que cubra el frotis y se dejaron en reposo por durante 20 minutos, luego de los cuales se lavaron con agua destilada. Luego se colocaron unas cuantas gotas de la solución Picroíndigocarmín hasta que cubra la lámina y se dejó actuar el colorante por 1 minuto. Se aclararon las láminas con etanol al 96 % y se dejó secar a la temperatura ambiente para luego montar la placa con aceite de inmersión. Las observaciones microscópicas se realizan con objetivo 100 X.

### **Toma de muestras en la escena de un crimen**

El procedimiento en la escena del crimen corresponde a una secuencia ordenada y jerarquizada de acciones, siendo el oficial de mayor rango el encargado de todos los que conforman el equipo completo. La prioridad es que todo el equipo debe regresar a salvo luego de cada operativo. Llegando a la escena del lugar de los hechos, se debe esperar al Fiscal asignado para proceder al procesamiento de muestras y para el mejor recojo de evidencias e información del delito ejecutado en el lugar de los hechos. Todo procedimiento debe ser realizado por el profesional con experiencia y conocimiento científico, empleando los métodos indicados en el Manual del laboratorio, así como la delimitación y seguridad del entorno.

En la escena del crimen, se realizan los siguientes procedimientos: primero, el levantamiento del croquis de la escena del crimen, de ahí se hace una perennización de la escena del crimen con ayuda del fotógrafo forense, luego la instalación de hitos de señalización para el establecimiento del orden de los hechos, y finalmente la búsqueda de evidencias (Figura 1).

## Figura 1

### *Búsqueda de evidencia en la escena del crimen*



Luego de revisar la escena del crimen, se procede a ampliar el perímetro del recojo de evidencias con su respectivo rotulado y establecimiento de la cadena de custodia, para culminar con el cierre de la escena del crimen (Figura 2).

A continuación que las evidencias han sido fijadas, señaladas y fotografiadas en la escena del delito, se deben trasladadas al laboratorio cuidando el procedimiento de embalaje para cada tipo de prueba, siguiendo la cadena de custodia. Los objetos muy pequeños deben ser recogidos con ayuda de pinzas y ser colocados en bolsas limpias, o sobres de color amarillo grandes o pequeños, todos rotulados. Los cabellos, vellos, papeles higiénicos, preservativos, prendas interiores y toallas higiénicas, son las principales evidencias identificadoras del hecho de Violación Contra Libertad Sexual.

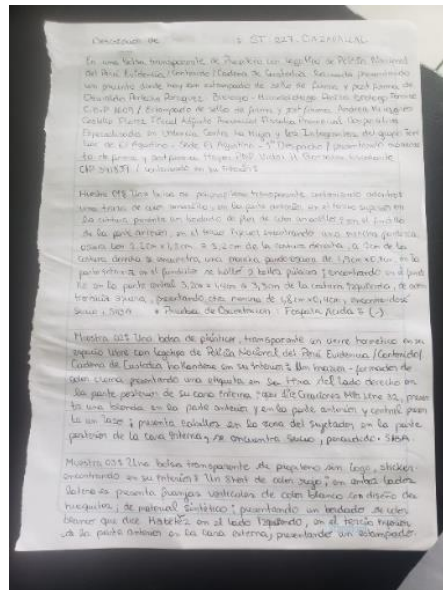




Al llegar al laboratorio de Biología Forense el jefe del Laboratorio designa al perito correspondiente, el cual empieza con el deslacrado y paralelamente hace la respectiva descripción de la muestra (Figura 3), aplicando métodos de orientación como el reactivo de la Fosfatasa Acida para confirmar si es semen y usar la prueba RSID-Semen para saber si es semen de humano o de animal. Finalmente se realiza el método de certeza que sería la observación microscópica, habiendo aplicado el protocolo de la técnica de coloración de Christmas Tree, para proceder a la visualización de espermatozoides y confirma positividad en el supuesto caso de violación sexual (Figura 4).

**Figura 3**

*Acta de descripción de la muestra.*



**Figura 4**

*Análisis de muestra en el Laboratorio de Biología Forense.*

**3.7. Análisis de datos**

Los datos registrados se procesaron por medio de herramientas de la estadística paramétrica, aplicando la prueba de T-Student para muestras independientes, procesado con el programa SPSS v.14 para Windows. El intervalo de confianza utilizado para el análisis estadístico fue de 95% ( $p < 0.05$ ). Los datos fueron sistematizados en gráficos y tablas utilizando el programa Microsoft Excel, con el cual se calcularon también las frecuencias en porcentajes.

## IV. RESULTADOS

Se analizaron 48 láminas para cada una de las coloraciones, haciendo un total de 96. Las muestras fueron procesadas los días 1, 7 y 15 después del procesamiento de las muestras, y se observaron al microscopio compuesto con objetivo 100X verificando la morfología de los espermatozoides. La forma de los espermatozoides fue descrita como Completo si se lograban observar todas las partes del espermatozoide (cabeza, cola), o Incompleto, si solo se podía observar la cabeza del espermatozoide.

La Tabla 2 muestra los resultados de las observaciones realizadas, observándose en el caso de las muestras de semen que, para la coloración con Hematoxilina- Eosina, que en las láminas preparadas el día 1 hubo una mayor visualización de espermatozoides completos y en mayor cantidad. Con la coloración Christmas Tree se observó un mayor número de espermatozoides incompletos en comparación con la otra coloración, pero en menor cantidad. En el día 7 se pudieron observar con la coloración Hematoxilina- Eosina una mayor cantidad de espermatozoides incompletos mientras que con la Coloración Christmas Tree se observaron una mayor cantidad de espermatozoides completos. Estos mismos resultados se obtuvieron en las muestras procesadas el día 15.

**Tabla 2**

*Resultados obtenidos de espermatozoides para las muestras de semen con la Coloración de Christmas Tree y Hemaxotilina- Eosina.*

N°	Volumen	Tipo De Coloración	DIA 1		DIA 7		DIA 15	
			Espermat. Completos	Espermat. Incompletos	Espermat. Completos	Espermat. Incompletos	Espermat. Completos	Espermat. Incompletos
1	1 ml	CCT	2	15	15	1	15	
2	1 ml	CCT	1	18	1	16	2	18
3	1 ml	CCT	18		16			16
4	1 ml	CCT	17		15		17	
5	1.5 ml	CCT	1	14	15		1	15
6	1.5 ml	CCT	17		20			14
7	1.5 ml	CCT	16		19		18	
8	1.5 ml	CCT	17		16		16	
9	1 ml	CHE	1	13	14		1	17
11	1 ml	CHE	17			17		14
12	1 ml	CHE	16		17		2	20
13	1.5 ml	CHE	18			19	16	
14	1.5 ml	CHE	15	1		17	17	
15	1.5 ml	CHE	13		18	1		15
16	1.5 ml	CHE	15			16		16
<i>PROMEDIO</i>			12.625	10.33333333	15.08333333	12.42857143	10.5	16.1

*Leyenda: CCC: Coloración Christmas Tree. CHE: Coloración Hematoxilina Eosina.*

En el caso de las mezclas de semen y orina en primer lugar se notó que, cuando el volumen de muestra fue de 1 ml y se usó la Coloración Hematoxilina- Eosina, hubo mayor dificultad para diferenciar espermatozoides con otras células, mientras que con un volumen de 1.5 ml de muestra y el mismo colorante, sí se logró diferenciar los espermatozoides. En cambio, con ambos volúmenes de muestra y utilizando la Coloración Christmas Tree, la diferenciación de espermatozoides de otros tipos celulares fue mucho mejor, además de contar mayor número que con la coloración de Hematoxilina- Eosina. La diferenciación de espermatozoides usando ambos colorantes fue totalmente correcta con las muestras procesadas a los 7 y 15 días de almacenamiento.

La Tabla 3 muestra los resultados de las visualizaciones realizadas con muestras de orina y semen mezclados en partes iguales. Se puede observar en primer lugar que existe una tendencia a disminuir el número de visualizaciones de espermatozoides en las muestras según el tiempo de almacenamiento, pero que, en general, la coloración Christmas-Tree permitió la visualización de mayor número de espermatozoides completos que la coloración con Hematoxilina-Eosina.

La Figura 5 muestra los resultados de la observación microscópica de espermatozoides en muestras de semen (1A y 1B) y orina (1C y 1D) coloreadas con la técnica de Christmas Tree (1A y 1C) y Hematoxilina-Eosina (1B y 1D), observándose principalmente que la técnica de Christmas Tree permite una coloración diferencial de espermatozoides, con la cabeza de tonalidad rojiza y la cola de color verde-azulado, mientras que la técnica de Hematoxilina Eosina colorea toda la muestra del mismo tono rojo.

**Tabla 3**

*Resultados Obtenidos de Espermatozoides para las muestras de semen y orina con la Coloración de Christmas Tree y Hematoxilina Eosina*

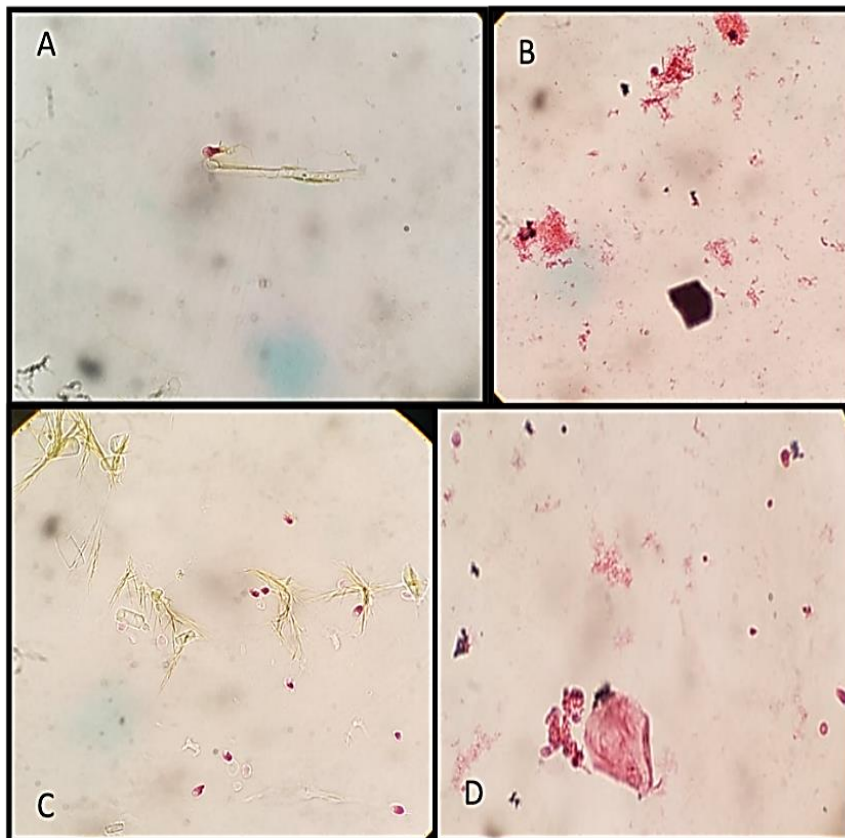
N°	Volumen	Tipo De Coloración	DIA 1		DIA 7		DIA 15	
			Espermat. Completos	Espermat. Incompletos	Espermat. Completos	Espermat. Incompletos	Espermat. Completos	Espermat. Incompletos
1	1 ml	CCT	20	12	18	10	16	3
2	1 ml	CCT		14		11		9
3	1 ml	CCT	18	10	11	8	8	5
4	1 ml	CCT	15	1	13		11	
5	1.5 ml	CCT	16	5	16	5	12	5
6	1.5 ml	CCT	13	17	11	15	11	12
7	1.5 ml	CCT	18	12	15	10	13	8
8	1.5 ml	CCT	4	19	3	15	1	11

9	1 ml	CHE	6	16	4	13	3	10
10	1 ml	CHE	4	12	2	10	1	8
11	1 ml	CHE		17		15		13
12	1 ml	CHE	5	18	3	14		10
13	1.5 ml	CHE	6	15	2	12		10
14	1.5 ml	CHE	14	4	11	2	8	
15	1.5 ml	CHE		19		15		9
16	1.5 ml	CHE	2	11	1	8		5
<i>PROMEDIO</i>			10.85	12.63	8.46	10.87	8.4	8.43

*Leyenda: CCC: Coloración Christmas Tree. CHE: Coloración Hematoxilina Eosina.*

### Figura 5

*Observación al microscopio de muestras de semen (A y B) y de orina (C y D) coloreadas con la técnica Christmas Tree (A y C) y Hematoxilina Eosina (B y D). Fuente: Foto tomada en la DIRINCRI.*

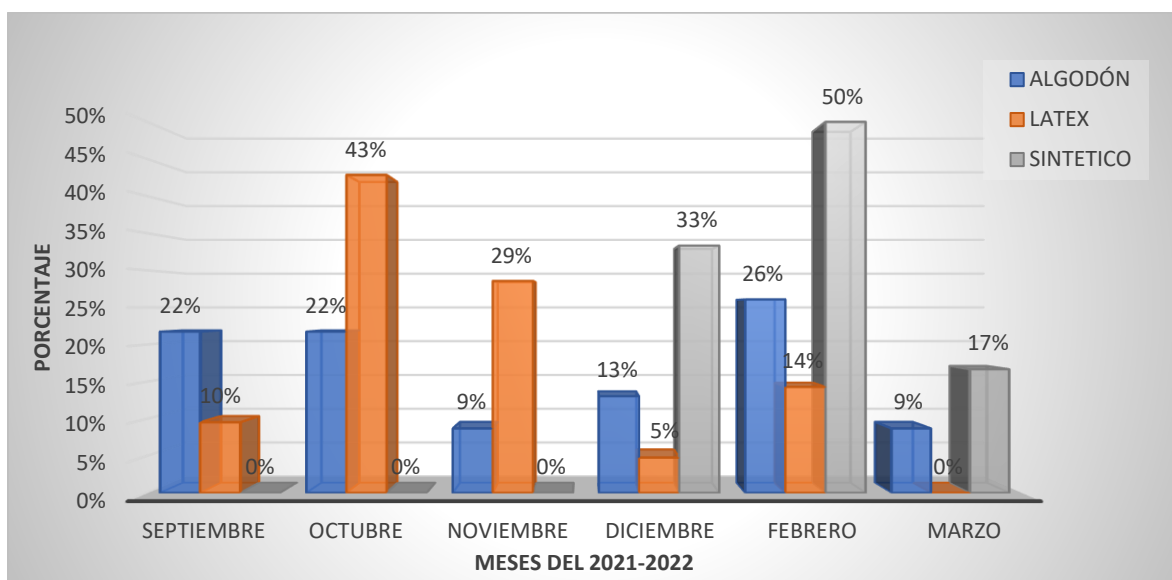


En el presente estudio se analizó el material del soporte impregnado de espermatozoides obtenidos como evidencias en un crimen de violación sexual durante 6 meses de evaluación por efecto y utilizando la coloración Christmas Tree. Las muestras de semen fueron obtenidas directamente en las escenas del crimen, de las víctimas y de las muestras enviadas al laboratorio, y se analizaron por medio de la impregnación de semen en tres tipos de soportes (fibra de algodón, fibra sintética y látex). Se prepararon un total de 50 láminas con sedimento recuperado de semen para cada soporte, respectivamente. Se procedió a colorear las láminas con tinción Christmas Tree y se observaron 3 campos por lámina a 1000 aumentos utilizando un microscopio compuesto con objetivo de 100x de aumento. La Figura 6 muestra los resultados de observación de espermatozoides obtenidos a partir de distintos tipos de sustratos colectados en escenas del crimen, observándose que en el mes de octubre el material de soporte con mayor frecuencia de colección fue látex. En cambio, en el mes de noviembre y febrero, el material de soporte con mayor frecuencia de colección en la escena del crimen fue algodón, a diferencia del mes diciembre, donde el soporte sintético fue el de mayor frecuencia de colecta.



**Figura 6**

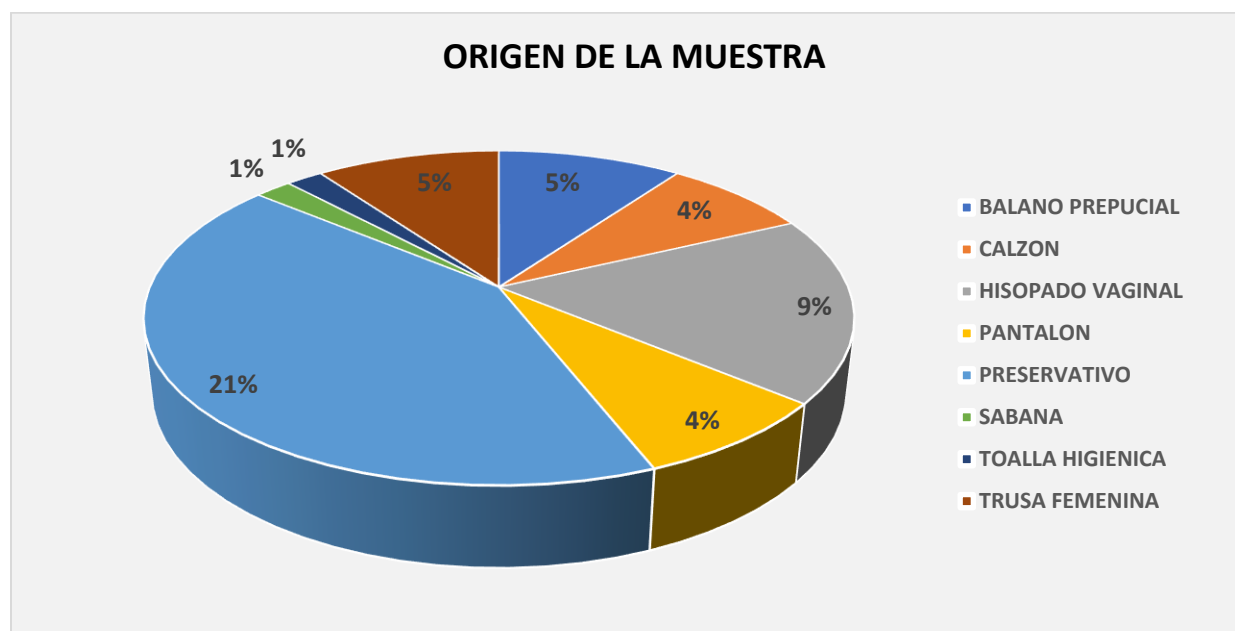
*Distribución de material de soporte en diferentes muestras durante el periodo de estudio*



La figura 7 muestra la frecuencia de obtención de muestras de espermatozoides según su origen, como materiales porosos o absorbentes (como toallas higiénicas y trusas femeninas), materiales compactos no absorbentes (prendas como un pantalón y sábanas), en prendas de tela procedente de la víctima (por ejemplo, calzón), o del mismo agresor o la víctima, mediante hisopados de la secreción vaginal y balano-prepucial. Se puede observar que el origen de la muestra de mayor porcentaje fue preservativo (21%), a diferencia de las toallas higiénicas (1%).

**Figura 7**

*Distribución de la descripción de la muestra en el periodo de estudio.*



La Tabla 4 muestra la frecuencia de espermatozoides completos e incompletos encontrados según el tipo de soporte que conforma la evidencia analizada, observándose que hay una mayor posibilidad de obtener espermatozoides incompletos en muestras de algodón y sintéticas (58% y 59%, respectivamente), mientras que hay una mayor frecuencia de recuperación de espermatozoides completos (59% en las muestras de látex).

**Tabla 4**

*Porcentaje de las formas completas e incompletas de espermatozoides según el tipo de soporte*

Tipo de Soporte	Espermatozoides Completos	Espermatozoides Incompletos
Algodón	42%	58%
Látex	59%	41%
Sintético	41%	59%

En el análisis del tiempo de permanencia de los espermatozoides, se estableció intervalos, según los tiempos definidos, realizando la observación microscópica y discriminando entre espermatozoides completos e incompletos. En el cuadro se presenta el porcentaje de espermatozoides contados según su variación morfológica.

La Tabla 5 muestra el porcentaje de espermatozoides completos e incompletos según el tiempo de permanencia, observándose que, en general, se observa una mayor frecuencia de espermatozoides incompletos que completos, aunque en muestras de 6 y 7 días de antigüedad se observó mayor número de espermatozoides completos, los que disminuyeron notoriamente en los días 8 y 9.

**Tabla 5**

*Formas completas e incompletas de espermatozoides según el tiempo de permanencia*

<b>Tiempo de Permanencia</b>	<b>Espermatozoides Completos</b>	<b>Espermatozoides Incompletos</b>
1 día	0%	0%
2 día	41%	59%
3 día	50%	50%
4 día	44%	56%
5 día	48%	52%
6 día	59%	41%
7 día	61%	39%
8 día	25%	75%
9 día	33%	67%
10 día	30%	70%
11 día	62%	38%
14 día	0%	0%

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se observó la visualización e identificación de la cabeza y cola de los espermatozoides con las diferentes coloraciones analizadas, un factor muy importante para la identificación morfológica del espermatozoide y que depende del tipo de muestra, ya que los espermatozoides retienen el colorante según el soporte de la muestra. Existen diversas técnicas de tinción definidas para la evaluación tradicional de la morfología espermática como Giemsa, Hematoxilina de Harris, Papanicolau, Gram, etc. (Mayoral et al., 2006) que, sin embargo, no producen una intensidad de coloración suficiente como la que brinda la técnica de Christmas Tree que se reflejó en los resultados obtenidos, lo que la convierte en una técnica apropiada para la visualización y análisis de los espermatozoides en diferentes muestras.

Al comparar las dos coloraciones, hallamos diferencias en la especificidad del contraste dado por los colorantes. La técnica de Christmas Tree (Quispe-Mayta et al., 2010) presenta especificidad para las estructuras espermáticas celulares (Figura 1), mientras que la técnica de Hematoxilina-Eosina esta cualidad está ausente.

Es factible la identificación de los espermatozoides en manchas de semen recientes, pero se complica al transcurrir el tiempo. La coloración de las cabezas de espermatozoides en la coloración Christmas Tree y Hematoxilina- Eosina se debe a que los reactivos utilizados en ambas coloraciones son colorantes básicos; es decir, tienen gran afinidad por elementos celulares ácidos, como el material nuclear. Este resultado es sumamente importante porque a pesar del tiempo en

el cual la muestra ha sido guardada para su posterior análisis (el mismo día, a los siete días y a los 15 días), aún es posible de observar formas completas (cabeza y cola) e incompletas (solo cabezas) de espermatozoides humanos. Esto es apoyado por lo señalado en el Manual de Criminalística (PNP, 2006), respecto a la detección de espermatozoides móviles e inmóviles en líquido de lavado vaginal 24 horas después de un caso de violación.

En el presente trabajo se ha observado que la contaminación con orina presenta muchas células como cilindros, células epiteliales relacionadas con la orina y la piel, entendiéndose que con la coloración Christmas Tree se pueden diferenciar de los espermatozoides (Figura 5). Existen varios métodos para detectar semen en una muestra, pero presentan limitantes como la poca accesibilidad de reactivos, por lo que algunos investigadores rechazan este tipo de procedimientos (Mendoza et al., 2004).

Del procedimiento de las coloraciones utilizadas en la presente Tesis se han resumido las ventajas y desventajas de las mismas para una mejor apreciación en la conveniencia de la técnica de Christmas Tree (Tabla 6).

**Tabla 6**

*Ventajas y Desventajas de las técnicas Christmas Tree y Hematoxilina- Eosina para visualización microscópica de espermatozoide*

	<b>CHRISTMAS TREE</b>	<b>HEMATOXILINA-EOSINA</b>
<b>Ventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Existe diferenciación celular por partes ya que la cabeza se tiñe de color rojo/fucsia, y la cola verde o azul verdoso.</li> <li>· Gracias a la diferenciación celular se pueden reconocer estructuras separadas, es decir reconocer solo los espermatozoides.</li> <li>· El procedimiento es fácil de realizar.</li> <li>· Es una técnica de coloración estandarizada a nivel Nacional que permite validar la identificación de Espermatozoides y sirva de evidencia en un juicio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Es una técnica de coloración sencilla y fácil de realizar.</li> <li>· Los reactivos son de dominio popular lo cual los hace más fáciles de obtener</li> <li>· Debido a la baja complejidad de la técnica la hace más económica y accesible.</li> <li>· Es una técnica de coloración de dominio popular en el área clínica y en laboratorios de investigación.</li> <li>· Es de conocimiento general.</li> </ul>
<b>Desventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Los reactivos son especializados, algo complicado de conseguir para particulares.</li> <li>· Es una técnica con complejidad alta por lo cual genera un mayor costo y accesibilidad.</li> <li>· No es de conocimiento general</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· No existe diferenciación de estructuras del espermatozoide ya que se tiñe de un solo color rosado.</li> <li>· No es una técnica de coloración estandarizada para la identificación de espermatozoides por lo cual no se puede utilizar de manera sola, nos debemos apoyar en un Estándar reconocido por la función judicial como la técnica de Christmas Tree</li> </ul>

En la Figura 6 se observa el porcentaje de recuperación de espermatozoides según el mes de trabajo, observándolos al microscopio mediante la técnica de Christmas Tree, desde soportes como fibra de algodón, fibra sintética y látex. Torres (2007) considera que es importante proteger muestras de semen que se encuentran sobre soportes bioquímicamente inertes y secos en el cual se encuentra adherido. Por esta razón, los artículos deberán manejarse con mucho cuidado, no deberán doblarse ni enrollarse la parte manchada y no deberá someterse a fricción, que influye en el material del soporte ya que, por ejemplo, a diferencia de soportes orgánicos naturales, el soporte

de fibra sintética posee mayor elasticidad y alta resistencia. Estas diferencias se confirman porque la naturaleza del látex tiene propiedades y características absorbentes y degradantes. Esta información es de importancia porque permite inferir que no necesariamente existe una eyaculación interna en el canal vaginal, el canal del recto o en la cavidad bucal durante la violación, ya que en algunos casos se puede eyectar externamente y por lo tanto el semen queda expuesto al roce con las prendas de la víctima y de la escena del crimen. Ledray (2001) cita los trabajos de Groth y Burgess en 1977, respecto a que el 34 % de los violadores son sexualmente disfuncionales, lo que generaría eventos de eyaculación precoz fuera de la víctima, y el de Larkin y Paolinetti en 1998, quienes anotaron que en muchos casos los violadores usan preservativo.

La Figura 7 muestra el porcentaje de las muestras analizadas para espermatozoides según el origen de la muestra, observándose que de 50 muestras analizadas; el mayor número de espermatozoides se observó en preservativos (21 %) a diferencia de hisopados vaginales (9 %). Estas diferencias se confirman porque la naturaleza del hisopado, siendo algodón, tiene propiedades y características absorbentes. López (1982) señaló que, en los delitos contra la libertad sexual, el semen es la muestra más frecuente y puede hallarse en las víctimas o en sus prendas, las cuales con el tiempo pueden contener manchas seminales secas, por lo que la mayor cantidad de indicios que se hallan en la escena del crimen y son remitidas al laboratorio en la investigación de estos delitos son las prendas de vestir de las víctimas y de los sospechosos de haber cometido el acto. También se consignan líquidos de lavado vaginal, anal, o segregado diversos de la víctima, pero es excepcional que se encuentre esperma fresco en las intervenciones periciales por violación. Solo se logra obtener muestras de semen fresco principalmente en casos con requisitoria, extrayéndose pruebas de hisopado vaginal y balano prepucial a la posible víctima y al posible sospechoso respectivamente.

La Tabla 4 muestra que por lo general se pueden recuperar espermatozoides incompletos de soportes de tipo algodón y sintéticos, mientras que en los soportes de látex se puede esperar con mayor probabilidad la recuperación de espermatozoides completos en muestras de tipo látex. Esto puede ser explicado porque las muestras de algodón y sintéticas se centrifugan a 2500 o 3000 rpm por 5 minutos, velocidad que puede generar fragmentación del espermatozoide, con pérdida de la cola no por degradación de la muestra sino por la fuerza centrífuga. Por lo contrario, la obtención de espermatozoides a partir de las muestras de látex es directa, a través de un frotis, sin ser centrifugadas, lo que explicaría el mayor número de visualizaciones de espermatozoides completos. López Támara (2013) señala que, en el procesamiento de las muestras, un factor determinante es la naturaleza física de la prenda analizada, y que el soporte de látex tiene una mayor capacidad de retención de los espermatozoides, luego le seguiría el soporte de algodón, lo que guarda coherencia con el estudio realizado.

La Tabla 5 muestra el porcentaje de espermatozoides completos e incompletos según el tiempo de permanencia, observándose por lo general una mayor frecuencia de espermatozoides incompletos que completos, y que hubo una reducción muy acentuada de observación de espermatozoides completos en los días 8 y 9, lo que puede deberse a la degradación de espermatozoides debido al procesamiento de las muestras (por ejemplo, primero una rehidratación del soporte y luego uso de centrifugación). El tiempo que pasa desde la formalización de la denuncia hasta el tiempo de la toma de muestra y/o entrega de prendas es crucial, tal como señala Gómez (2009) quien indica que hay una relación inversamente proporcional entre el tiempo de análisis de las muestras y la posibilidad de recuperar espermatozoides (sobre todo completos).



Los resultados obtenidos permiten señalar el gran aporte que otorga el análisis de prendas y otras muestras obtenidas en la escena de una violación para la búsqueda de señales de semen, las cuales pueden servir tanto para realizar análisis a nivel de ADN como para la observación directa al microscopio (García, 2012).

## VI. CONCLUSIONES

- Se estableció que el tiempo de permanencia de espermatozoides sometidos al efecto de coloración de Christmas Tree para el soporte de algodón, inicia con mayor número de espermatozoides incompletos observados a los 2 días y que permanece hasta los 10 días.
- Se estableció que el tiempo de permanencia de espermatozoides sometidos al efecto de coloración de Christmas Tree para el soporte sintético, inicia con mayor número de espermatozoides incompletos observados a los 2 días y que permanece hasta los 10 días.
- Se estableció que el recuento de espermatozoides completos es diferente según el tipo de soporte, siendo el promedio de 41 espermatozoides para el soporte sintético, el promedio de 42 espermatozoides para el soporte de algodón y el promedio de 59 espermatozoides para el soporte de látex.
- Se estableció que el recuento de espermatozoides incompletos se diferente según el tipo de soporte, siendo el promedio de 59 espermatozoides para el soporte sintético, el promedio de 58 espermatozoides para el soporte de algodón y el promedio de 41 espermatozoides para el soporte de látex.

## VII. RECOMENDACIONES

- Es necesario difundir y capacitar a los operadores de justicia como son: Poder Judicial, Ministerio Público, Policía Nacional del Perú, Ministerio de la Mujer; con la participación de Colegios de Médicos, Defensoría del Pueblo y otros entes Públicos y Privados a fin de que se pueda optimizar la eficacia de los análisis de pericias biológicas en espermatozoología forense. Los responsables deben mejorar en lo que respecta a los conocimientos de los conceptos básicos y teorías e interpretación del artículo 170° del código penal, con el fin de brindar una herramienta útil, respecto a las bases científicas del tiempo de permanencia y variación morfológica de los espermatozoides en casos de violación sexual para el estudio de prendas o pruebas de las víctimas.
- Con los análisis de los resultados de la investigación, se puede deducir y resaltar la importancia de recuperar la ropa interior, ropa de cama (sábanas, fundas) que usa la víctima al momento de la violación, a que puede llegar a convertirse en el indicio que aporte la información necesaria para esclarecer el hecho delictivo. Preparándose por separado cada prenda de la víctima o el agresor que interese en la investigación, en sobres limpios que garanticen la conservación y recupero de información, con el debido principio de cadena de custodia.

- Con esta investigación realizada se busca continuar desarrollando investigaciones dirigidas a conocer las diferentes variables que influyen en la probabilidad de encontrar espermatozoides en víctimas de agresión sexual.

## VIII. REFERENCIAS

- Arroyo-Sánchez, G. (2016). Valoración Médico Legal de la víctima de delito sexual. *Medicina Legal de Costa Rica*. 33(1), 126-132
- Atienza, I. y Martínez, P. (2010). Identificación de vestigios de semen. En S. Delgado (Ed.), *Patología y Biología Forense: Tratado de Medicina Legal y Ciencias Forenses III* (993-1013). Editorial Bosch.
- Carma, C. (08 de enero del 2011). *Métodos de reconocimiento, identificación e individualización de manchas de semen. Ira parte*. [Procedimientos policiales Venezuela]. Recuperado de: <http://procedimientospolicialesvenezuela.blogspot.com/2011/01/metodos-de-reconocimiento.html>
- Carreño, J. (2009). “Aspectos y técnicas de evaluación médico legales en menores / víctimas de DCLS” [Diapositiva] Lima: instituto de Medicina Legal - Ministerio Público. 85 diapositivas. Recuperado: [Consulta 5 de julio del 2012]
- Cisneros, J., y Villarroel, C. (2016). *Determinación de proteína p-30 y rastreo de espermatozoides en personas víctimas de agresión sexual en el centro de investigación de ciencias forenses-Tungurahua en el período enero-agosto 2015*. (Tesis de Pregrado). Universidad nacional de Chimborazo, Facultad de ciencias de salud.

Código Penal. (s.f.). Jurista Editores.

Cortés, M. R., Cantón, J. y Cantón, D. (2011). Naturaleza de los abusos sexuales a menores y consecuencias en la salud mental de las víctimas. *Gaeta Sanitaria*. 25(2), 157–165

Cuiza, C. (2016). Labor de la Sección de Biología Forense en la investigación de delitos sexuales en el instituto de investigaciones forenses IDIF Sucre. *Arch. Boliv. Med.* 16(84), 13-16.  
[http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-05252011000200003&lng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-05252011000200003&lng=es)

Davies A. y Wilson E. (2010). The persistence of seminal constituents in the human vagina. *Metrop Pol Forens Sci Lab*, UK.

Del Río, M., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M., Moreno, R., y Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev. Int Androl.*, 5(4), 368-373.

Esquivias, R.W. (2018). *Estudio De Las Variaciones Morfológicas Y Tiempo De Permanencia De Los Espermatozoides Impregnados En Dos Tipos De Soporte Sometidos Al Efecto De Escherichia Coli, Con Fines En La Investigación Forense. Arequipa 2018.* (Tesis. Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa Escuela De Posgrado Unidad De

Posgrado De La Facultad De Ciencias Histórico Sociales). <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/7108>

Fiscalía General Del Estado De Ecuador. Sistema Especializado Integral De Investigación, De Medicina Legal Y Ciencias Forenses. (2016). *Manual De Procedimientos del Laboratorio De Biología Forense*. Recuperado en [http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/COIP%20073%20FGE/Area%20Ciencias%20Forenses/6\\_\\_Manual\\_de\\_Procedimientos\\_de\\_laboratorio\\_de\\_Biologa\\_Forense.pdf](http://www.fiscalia.gob.ec/files/archivos%20AC/COIP%20073%20FGE/Area%20Ciencias%20Forenses/6__Manual_de_Procedimientos_de_laboratorio_de_Biologa_Forense.pdf)

Frías, J., Cáceres, V., Monge, A., y Lescano, P. (2019). Investigación científica forense mediante técnicas de coloración en casos de delito sexual. *Revista electrónica Ciencia Digital*, 3(1.1), 90- 98. <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v3i1.1.361>

García J.& M.A. (2012). *Asociación de resultados obtenidos en análisis para la detección de semen y espermatozoides y la obtención de perfiles genéticos de sospechosos de violación sexual*. Universidad San Carlos de Guatemala. [Tesis para optar el título de Químico Biólogo]. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_3310.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3310.pdf)

Gómez N. H. (2009). Hallazgo de Espermatozoides en Muestras de Contenido Vaginal respecto al Lapso de Tiempo del Ataque Sexual Reportado en Delitos contra la Libertad Sexual atendidos en la División Médico Legal B de Huaura, Lima – Perú.

Ledray, L. y Faan, RN LP (2001). Evidence Collection and Care of the Sexual Assault Survivor The SANE-SART. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.208.7427&rep=rep1&type=pdf>

Lingappa, H. A., Govindashetty, A. M., Krishnamurthy, A., Puttaveerachary, A. K., Manchiaiah, S., Shimoga, I. C., Mallaradhya, S. H., & Gowda, S. B. (2015). Quest for An Ideal, Simple and Cost-Effective Stain for Morphological Assessment of Sperms. *Journal of clinical and diagnostic Reserach: JCDR*, 9(10), EC01–EC4. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13270.6655>

López, L. (1953). *Técnica médico-legal. Criminalística*. Editorial Saber.

López, L. (1982) *Técnica médico-legal. Criminalística*. Editorial Saber.

López, T., K. (2013). *Reconocimiento e Identificación de manchas de Semen en diferentes soportes de interés forense*. (Informe de Practicas Pre Profesionales). Universidad Nacional Federico Villareal. <https://docplayer.es/6346917-Reconocimiento-e-identificacion-de-manchas-de-semen-en-diferentes-soportes-de-interes-forense-katty-lopez-tamara.html>

Mayoral, AG. Campos, E. Martínez, L. Hernández, P. y Pérez, E. (2006). Identificación forense de fluido seminal. *Lab-acta* 2006, 18, 43-6



Megías, M., Molist, P. y Pombal, MA. (2019). *Atlas de histología vegetal y animal*.

Recuperado (fecha de consulta) de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>

Mendoza Díaz, N., Aguirre Castañeda, R. y Del Castillo Mori, A. (2004) *Evaluación de la sensibilidad del cultivo de semen en el diagnóstico de prostatitis bacteriana crónica*. *Rev Med Hered*, 15(1), 37-43.

Monteiro, R., Casemiro, P., Risso, P., y Hallak, J. (2016). An easy, reproducible and cost-effective method for andrologists to improve the laboratory diagnosis of nonobstructive azoospermia: a novel microcentrifugation technique *Int. braz j urol*, 42(1), 132-138.  
<https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0090>

Narváez, L. (2016). Tinción de Árbol de Navidad. Genially; [08 de diciembre del 2016];  
Disponible en: <https://www.genial.ly/57fb0b92b6c04f34986ed378/tincion-arbol-de-navidad>

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2013). Informe de la OMS destaca que la violencia contra la mujer es “un problema de salud global de proporciones epidémicas. Nuevas guías de práctica clínica y de políticas lanzadas para orientar la respuesta del sector salud, en Comunicado de prensa 20 de junio de 2013 Ginebra. [En línea]. Disponible en: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/violence\\_against\\_women\\_20130620/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/violence_against_women_20130620/en/). Fecha de consulta: 30 de marzo de 2017.

Pavesi, A., Paparella, C., Bouvet, B., and Pituelli, N. (2008). Prostatic acid phosphatase activity in basal seminal plasma and post exposition to high temperature. *Biocell*. 32(3), 29.

Pavesi, A., Paparella, C., and Bouvet, B. (2011). Lactate deshidrogenase: activity in human seminal plasma. *Biocell*. 35(2), 179.

Pello, G., R. y Ramírez, M., E., (2010). Análisis básico del semen. Disponible en: <http://www.aebm.org/jornadas/liquidos/LIQUIDO%20SEMINAL.pdf>.

Policía Nacional del Perú. (2012). Manual de criminalística. Recuperado de: [https://www.academia.edu/31940160/Manual\\_de\\_criminalistica\\_140908221053\\_phpapp\\_02\\_1](https://www.academia.edu/31940160/Manual_de_criminalistica_140908221053_phpapp_02_1)

Policía Nacional del Perú. (2006). Manual de Criminalística. (2da Ed.) Dirección de Criminalística. Perú.

Prieto V. (2009). *El Estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de biología*. [Tesis de Postgrado]. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla

Quispe-Mayta, S., Tarifa-Espinoza, S., Solíz-Pacheco, R. y Sierra-Gareca, A. (2010). Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense. *BIOFARBO*. 18(2), 91-99.

- Ruiz, V. (2004). *El estudio de las agresiones sexuales en el laboratorio de biología*. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla Canelo. [www.cej.justicia.es/pdf/publicaciones/medicos\\_forenses/MEDI28.pdf](http://www.cej.justicia.es/pdf/publicaciones/medicos_forenses/MEDI28.pdf)
- Stuart, J. (2005). *Forensic science: An introduction to scientific and investigative techniques*. Editorial Boca Raton
- Suttipapit, P. (2019). Forensic Spermatozoa Detection. *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* 40(4), 304-311. <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000517>
- Turvey, B.F. (2014). *Forensic victimology. Examining violent crime. Victims in investigative and Legal Context*. Elsevier.
- Triana, I., López, R., García, M., Santana, A., Fleites, M., & Sánchez, P. (2015). Caracterización morfométrica de espermatozoides en pacientes con espermograma normal (resultados preliminares). *Medicent Electrón.*, 19(4), 225-232. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30432015000400003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432015000400003).
- Toro, M., A. (2009). *Espermograma. Medicina & Laboratorio*, 15: 145-169. Módulo 14 (Tecnología) 11. Editora Medica Colombiana S.A
- Torres, Y. Et Al. (2007). Factores que afectan al análisis biológico de las muestras de agresiones sexuales. *Cuad Med Forense*.

Vega-Vega, C., Navarro-Escayola, E. y Edo-Gil, J. C. (2014). *Protocolo de actuación médico forense en los delitos contra la libertad sexual*. Revista Española de Medicina Legal. 40(3), 120-128.

Wheeler, B. y Wilson L., (2008). *Practical Forensic Microscopy: A Laboratory Manual*. Wiley Editorial.

World Health Organization [WHO] (2010). *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical-mucus interaction*.  
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>.

## IX.ANEXOS

Fecha de la muestra:

<i>Tipo de Soporte</i>						
( )	Algodón		( )	Sintetico	( )	Latex
<i>Tipo de fibra del soporte</i>						
( )	Algodón		( )	Sintético		
<i>Tiempo</i>	Unidad de Medida	Numero de campo en microscopio	Numero de espermatozoides observados			
			100x	Completos		
1	DIAS	1°				
		2°				
		3°				
2	DIAS	1°				
		2°				
		3°				
4	DIAS	1°				
		2°				
		3°				
8	DIAS	1°				
		2°				
		3°				
16	DIAS	1°				
		2°				
		3°				
30	DIAS	1°				
		2°				
		3°				
32	DIAS	1°				
		2°				
		3°				

Fuente: Propia del autor



de un delito contra la libertad sexual.					
--	--	--	--	--	--

1.15939.0025

1.15939.1000

## Microscopía

### Rojo nuclear sólido (C.I. 60760)

para microscopía **Ceristar®**

Producto sanitario para diagnóstico in vitro



El presente colorante "Rojo nuclear sólido (C.I. 60760) - para microscopía **Ceristar®**" es utilizado para el diagnóstico celular en la medicina humana y se emplea en el examen histológico de muestras de origen humano. Se trata de un colorante seco que se utiliza para la preparación de una solución de colorante, junto con otros materiales de diagnóstico in vitro pertenecientes a nuestra cartera, hace evaluables determinadas para el diagnóstico estructuras de destino (mediante fijación, dado el caso inclusión, tinción con la solución rojo nuclear sólido arriba indicada, **contratinción**, montaje) en material de examen histológico humano, como pueden ser cortes histológicos p. ej. del **útero**.

#### Principio

Con el rojo nuclear sólido se obtiene una tinción nuclear sencilla. El rojo nuclear sólido es un colorante ácido que pertenece al grupo de los colorantes de **ácido** quinona. A través de la adición de sulfato de aluminio, que en este caso hace de mordiente, se produce una laca colorante que permite la tinción nuclear en rojo.

El rojo nuclear sólido - sulfato de aluminio se utiliza como **contratinción** para reacciones histoquímicas como p. ej. tinciones de azul de Berlín para la **determinación** de hierro (p. ej. art. 107907, Kit de tinción para ADN según Feulgen) o **de** **ácidos** (p. ej. art. 100251, Kit de plateado de **óxido** según Gordon & Sweets o art. 100362, Kit de plateado según **van Kossa**). El Rojo nuclear sólido (C.I. 60760) - para microscopía **Ceristar®** también puede ser empleada como tinción nuclear para tinciones de azul **ácido**.

#### Material de las muestras

Como material de partida se emplean cortes de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (cortes parafínicos de 3 - 5 µm de espesor) así como frotis frescos y nativos de sangre o médula ósea.

#### Reactivos

Art. 115939  
Rojo nuclear sólido (C.I. 60760) 25 g, 1 kg  
para microscopía **Ceristar®**

#### Necesario además:

Art. 101102 **Aluminio** sulfato 18-hidrato 5 kg  
trozos **gris**, **En Sur**, **BP**

#### para la tinción de azul **ácido**:

Art. 101647 Azul **ácido** en solución 500 ml  
para microscopía

#### Alternativamente:

Art. 100121 **Rojo** nuclear en solución de aluminio sulfato al 0,1% 500 ml  
para microscopía

#### Preparación de las muestras

La toma de muestra debe ser realizada por personal especializado. Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con el estado de la tecnología. Todas las muestras deben estar rotuladas inequívocamente. Deben usarse instrumentos adecuados para la toma de muestras y en la preparación, y deben seguirse las instrucciones del fabricante para la aplicación / el empleo. Desparafinar de forma típica los cortes y rehidratar.

#### Preparación del reactivo

Para la realización de la tinción se puede utilizar una solución lista para el uso (art. 100121) o una solución de rojo nuclear - aluminio sulfato preparada por separado (de art. 115939).

#### Solución de aluminio sulfato 5 %, acuosa

Disolver 12,5 g de aluminio sulfato 18-hidrato en 237,5 ml de agua destilada.

#### Solución de rojo nuclear - aluminio sulfato 0,1 %

Introducir revolviendo 0,2 g de Rojo nuclear sólido **Ceristar®** en 200 ml de solución hirviendo de aluminio sulfato 5 %, acuosa. Dejar hervir durante 5 - 10 minutos.

Filtrar la solución de tinción recién preparada después de enfriar.

## Tinción nuclear / Tinción de conjunto

### Técnica

#### Tinción en la cubeta de tinción

Desparafinar de forma habitual los preparados histológicos y rehidratar en serie descendente de alcohol.

Los portaobjetos deberían ser escurridos bien por goteo después de los diferentes pasos de tinción, de esta manera se podrá evitar el innecesario amastre de **agua** **ácida**.

Para conseguir un óptimo resultado de tinción, deberían respetarse los periodos indicados.

Portaobjetos con preparado histológico	
Agua destilada	1 minuto
Solución de rojo nuclear sólido - sulfato de aluminio 0,1 %	10 minutos
Agua destilada	1 minuto
Etolol 70 %	1 minuto
Etolol 96 %	1 minuto
Etolol 100 %	1 minuto
Etolol 100 %	1 minuto
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos
Montar los preparados humedecidos con xileno con p. ej. <b>Entellan®</b> Nuevo y cubre-objetos.	

Los preparados histológicos pueden ser montados y almacenados con medios de montaje anhidros (p. ej. **Entellan®** Nuevo) y cubreobjetos después de la **deshidratación** (series de alcohol ascendentes) y la clarificación con xileno.

Para el análisis de preparados teñidos con un aumento microscópico >40x se recomienda el uso de aceite de inmersión.

### Resultado

Núcleos celulares rojo oscuro  
Citoplasma rojo claro

## Contratinción

### Técnica

Hay protocolos de tinción con ejemplos para la utilización del rojo nuclear sólido como **contratinción** en las correspondientes instrucciones de empleo para los productos pertenecientes a nuestra cartera (p. ej. Azul **ácido** **Ceristar®**, Art. 105234, Kit de plateado de **óxido** según Gordon & Sweets, Art. 100251, Kit de plateado según **van Kossa**, Art. 100362).

### Notas técnicas

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico.

Si se utilizan procesadores de histología y aparatos automáticos de tinción, deberán tenerse en cuenta las instrucciones de operación del fabricante, tanto del aparato como del software.

Filtrar la solución de tinción recién preparada después de enfriar.

Eliminar el aceite de inmersión en exceso antes de archivar.

### Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas.

Deberán emplearse terminologías vigentes.

Deberán elegirse y realizarse ensayos ulteriores según métodos reconocidos.

Cada aplicación debería implicar controles adecuados (p. ej. ISOSLIDE® **Reactivos**, art. 1.00361.0001) para descartar resultados erróneos.

### Almacenamiento

Guardar el Rojo nuclear sólido (C.I. 60760) - para microscopía **Ceristar®** de +5 °C a +30 °C.

### Estabilidad

Rojo nuclear sólido (C.I. 60760) - para microscopía **Ceristar®** se puede utilizar hasta la fecha de caducidad indicada.

Después de abrir el frasco por primera vez, el contenido almacenado entre +5 °C y +30 °C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada.

Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

### Notas sobre el empleo

#### Solamente para uso profesional.

Para evitar errores, la aplicación debería ser realizada por personal especializado. Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y **aseguramiento** de la calidad.

Deben emplearse microscopios equipados de acuerdo con el estándar.

Si es necesario, deberá utilizarse una centrifugadora que corresponda al estándar de laboratorios y a las exigencias.



### Protección contra infecciones

Debe observarse a toda costa una protección eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de laboratorio.

### Indicaciones para la eliminación de residuos

El envase debe ser eliminado de acuerdo con las directivas válidas de eliminación de residuos.

Las soluciones usadas y las soluciones caducadas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos. Podrá pedirse información sobre los procedimientos de eliminación bajo el Quick Link "Info for Disposal of Microscopy Products" en [www.microscopy-products.com](http://www.microscopy-products.com). Dentro de la UE tiene validez el REGLAMENTO (CE) N.º 1272/2008 sobre la clasificación, el etiquetado y el envasado de sustancias y mezclas, por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) N.º 1907/2006.

### Reactivos auxiliares

Art. 100121	Rojo nuclear en solución de aluminio sulfato al 0,1% para microscopía	500 ml
Art. 100251	Kit de plateado de retícula según Gordon & Saito para la detección de fibras reticulares en tejido histológico	1 set
Art. 100361	ISOSLIDE® Retícula Preparados de control con tejido de referencia para la detección de fibras reticulares en histología	25 tests
Art. 100362	Kit de plateado según van Kesteren para la detección de microcalcificaciones	1 set
Art. 100496	Formaldehído en solución 4%, tamponado, pH 6,9 (aprox. 10% de formalina en solución) para histología	350 ml y 700 ml (en frasco de cuello ancho), 5 l, 10 l, 10 l Topox
Art. 100579	DPX nuevo medio de montaje anhidro para microscopía	500 ml
Art. 100869	Estelias® nuevo para montadores de cubreobjetos para microscopía	500 ml
Art. 100974	Etanol desnaturalizado con aprox. 1 % de metilcelulosa para análisis EMSURE®	1 l, 2,5 l
Art. 101647	Azul alga en solución para microscopía	500 ml
Art. 104699	Aceite de inmersión para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 107907	Kit de tinción para ADN según Feulgen Para la determinación cuantitativa del contenido de ADN en muestras histológicas y citológicas	1 set
Art. 107961	Estelias® Nuevo medio de montaje rápido para microscopía	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 108298	Xileno (mezcla de isómeros) para histología	4 l
Art. 109016	Neo-Mount® medio de montaje anhidro para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 500 ml
Art. 109843	Neo-Clear® (sustituto de xileno) para microscopía	5 l
Art. 112084	HEMATOGNOST Fe® kit de tinción para visualizar hierro iónico libre (Fe <sup>2+</sup> ) en células corporales	4 x 250 ml
Art. 115161	Histogac® pastillas (sin DMSO) punto de solidificación 56-58°C, medio de inclusión para histología	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg

### Clasificación de sustancias peligrosas

Art. 115939

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta y las indicaciones en la ficha de datos de seguridad. La ficha de seguridad está disponible en el sitio web y a solicitud.

### Componentes principales del producto

Art. 115939

C.I. 80760

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

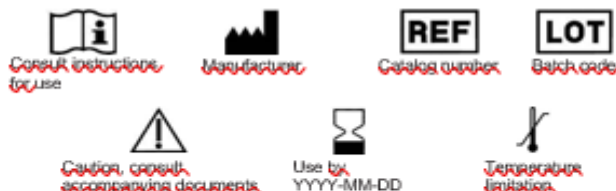
M = 357,28 g/mol

### Otros productos de IVD

Art. 100380	ISOSLIDE® Hierro Preparados de control con tejido de referencia para la detección de hierro libre en tejido histológico	25 tests
Art. 100425	ISOSLIDE® Azul alciano Preparados de control con tejido de referencia para la detección de calcificaciones en tejido histológico	25 test
Art. 105174	Hematoxilina en solución modificada según Gill III para microscopía	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 117081	Eosina A - Solución al 1%, alcohólica para microscopía	1 l

### Literatura

- Bornia - *Mikroskopische Technik*, Editores: Mutsch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Theory and Practice of Histological Techniques*, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- Corn's *Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains, and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine*, 10th Edition, (ed. Harman, R.W. and Kiernan, J.A.) 2002



Status: 2017-09-15

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany  
Tel. +49(0)6151 72-2440  
[www.microscopy-products.com](http://www.microscopy-products.com)

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

