

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TITULO:

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE
LA DETERMINACION DEL CINC
EN MANCHAS DE SEMEN Y SU
APLICACION MEDICO LEGAL.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Francisco Antonio García y Gómez

Dirigida por el profesor:

D. José María Ruiz de la Cuesta Cascajares

Madrid, 1994



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGIA
Y LEGISLACION SANITARIA

FACULTAD DE MEDICINA

PABELLON 7
TELEF. 394 15 77
FAX: 394 16 06
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

DON JOSE MARIA RUIZ DE LA CUESTA CASCAJARES, Director del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria,

CERTIFICA: Que don Francisco Antonio GARCIA Y GOMEZ ha realizado en este Departamento la Tesis titulada: ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA DETERMINACION DEL CINC EN MANCHAS DE SEMEN Y SU APLICACION MEDICO LEGAL, conforme a las normas que rigen en dicho Departamento.

Fdo.- J.M. RUIZ DE LA CUESTA

Madrid, 5 de julio de 1994

*A mis padres y,
a Mari Carmen, mi mujer.*

AGRADECIMIENTOS

No puedo por menos que mostrar, en la introducción de esta tesis, mi agradecimiento a todos cuantos han hecho posible, con su labor, constancia y estímulo la realización de este trabajo.

Al profesor José María Ruiz-de la Cuesta Cascajares, director del Departamento de Medicina Legal de la Universidad Complutense y director de la misma, por su labor de corrección, su comprensión y todas las facilidades prestadas.

Al Doctor Miguel Arroyo Vicente, jefe del Departamento de Absorción Atómica del Hospital Clínico de San Carlos, por su labor, su apoyo y mantenimiento de un constante y continuo interés en la marcha de la investigación.

Al Doctor Pedro Caballero Peregrin, jefe del Departamento de Andrología del Hospital Ramón y Cajal, gracias al cual nos fueron facilitadas las muestras de semen para efectuar nuestra investigación.

Al Doctor Fernando del Río de las Heras, Catedrático Director del Departamento de Prótesis Bucofacial, por su interés y apoyo constante.

A Don Manuel Sánchez Pantín, arquitecto, por su inestimable ayuda, labor de corrección y consejo en todo lo que le fue consultado.

A Doña María Rosa Castañeda, por su gran labor en la confección y planificación en la transcripción de la misma.

A mis compañeros y amigos del Departamento, por su interés y predisposición constante.

A todos ellos, gracias.

INDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>Pág.</u>
GENERALIDADES	2
MÉTODOS DE EVALUACIÓN	6
FOSFATASA ÁCIDA SEMINAL (PROSTÁTICA)	7
PERMANENCIA DE FOSFATASA ÁCIDA. PERMANENCIA DE LA ENZIMA EN UNA MANCHA SEMINAL SECA	13
MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SEMEN	14
OTROS TESTS INMUNOLÓGICOS	16
TESTS CRISTALOGRAFICOS	19
EL TEST BARBERIO	21
TEST DE PURANEN	22
MÉTODOS CROMATÓGRAFICO Y ELECTROFORÉTICO	23
CREATINA FOSFOQUINASA	24
LA ISOENZIMA LÁCTICO DESHIDROGENASA	24
ESTERASAS DE ESPERMA Y SEMINAL	25
OTROS MÉTODOS	25

MÉTODO ANALÍTICO

INTRODUCCIÓN	30
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	31-a

PARTE EXPERIMENTAL.	32
(I) Instrumentación	32
(II) Pinzas de Hartmann	32
(III) Reactivos	33
(IV) Material de Trabajo	34
(V) Procedimiento analítico	35
a) Preparación de las muestras	35
b) Análisis	36
RESULTADOS (MÉTODO)	39
DISCUSIÓN (MÉTODO)	39
DISCUSIÓN GENERAL	76
CONCLUSIONES	81

INDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
<u>TABLA 1</u>	42
Condiciones operatorias del equipo instrumental.	
<u>TABLA 2</u>	44
Valores de Zn en manchas de semen en tela. Muestras atacadas y llevadas a volúmenes finales diferentes.	
<u>TABLA 3</u>	47
Valores de concentración de Zn en manchas de diferentes especies de semen en distintas telas. Efecto de la concentración del metal procedente de éstas.	
<u>TABLA 4</u>	49
Manchas de semen (distintas especies) en la misma tela. Tres tomas (3 círculos) de muestra diferentes de cada una de las manchas, preparadas y analizadas independientemente.	
<u>TABLA 5</u>	59
Determinación de Zn en telas manchadas.	
<u>TABLA 6</u>	60
Determinación de Zn en telas manchadas de diferentes especies biológicas.	
<u>TABLA 7</u>	62
Determinación de Zn en manchas de semen.	
<u>TABLA 8</u>	65
Determinación de Zn en semen (distintas especies) y manchas de tela correspondientes.	

TABLA 9 69

Valor medio de las concentraciones de Zn en la totalidad de las superficies de las manchas en siete diferentes telas, para distintas especies de semen ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

TABLA 10 70

Valor medio de las concentraciones de Zn en la totalidad de las superficies de las manchas obtenidas con siete diferentes especies de semen, para distintas telas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

TABLA 11 71

Estudio estadístico de la relación comparativa entre los valores medios de concentración de Zn en manchas de semen en distintas clases de telas, correspondientes a siete especies de semen diferentes con las que se han manchado aquéllas.

TABLA 12 72

Estudio estadístico de la relación comparativa entre los valores medios de concentración de Zn en manchas correspondientes a siete telas diferentes, manchadas cada una de ellas con distintas especies de semen.

TABLA 13 74

Determinación de Zn en manchas de tela (prendas de vestir) en casos de violación comprobada.

TABLA 14 79

Concentración de Zn en las principales especies biológicas y capaces de generar manchas en prendas de ropa de vestir (valores medios).

INDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
<u>Figuras 1a y 1b</u>	43
Estudio de la dilución.	
<u>Figura 2</u>	45
Curva de precisión.	
<u>Figura 3</u>	48
Valores de la concentración de Zn en área de manchas con y sin corrección de blanco.	
<u>Figura 4</u>	50
Corrección del blanco.	
<u>Figura 5</u>	52
Resultados del análisis de diferentes círculos tomados de varias manchas conseguidas al manchar una tela con diversas muestras de un mismo semen, al que se le han realizado una serie de adiciones de cantidades conocidas de Zn.	
<u>Figura 6</u>	53
Reafirmación experimental.	
<u>Figura 7</u>	54
Reafirmación experimental.	
<u>Figura 8</u>	55
Reafirmación experimental.	

<u>Figura 9</u>	61
Resultados obtenidos al manchar 3 telas diferentes con un mismo semen adicionado y con soluciones acuosas de Zn de diferentes concentraciones.	
<u>Figura 10</u>	64
Correlación entre valores de concentración de Zn de diferentes especies seminales y los correspondientes a las manchas con ellas obtenidas.	
<u>Figura 11</u>	67
Máculas obtenidas en diferentes especies seminales. (A, B, C, D, E, G y H) en distintas telas (T).	
<u>Figura 12</u>	68
Valores medios de concentración de Zn ($X \pm ds$) en el total de las manchas obtenidas con diferentes especies seminales (A,B,C,D,E,G y H) en distintas telas.	

INTRODUCCIÓN

* GENERALIDADES *

La identificación de fluido seminal constituye un viejo problema en medicina legal, pese a no haber sido estimado como tal para la mayoría de la bibliografía anterior al siglo XIX. Florence publicó un interesante estudio de los procedimientos usados en el examen de supuestas víctimas de agresión sexual previo al siglo XX.

Los primeros esfuerzos sistemáticos para identificar fluido seminal mediante tests químicos, tuvieron lugar al mismo tiempo que surgían los procedimientos analíticos para identificar sangre en investigaciones médico-legales. En 1826, Olliver d'Angers y Barruel informaron de un caso de agresión sexual en el que ellos habían sido consultados. La sospecha se inclinaba a que ciertas manchas en la ropa fueron hechas con grasa de carne animal no cocinada. Los expertos examinaron las áreas manchadas de la ropa frente a controles de ropa sin manchar y las compararon con respecto a: la humidificación con agua, la naturaleza y color del extracto acuoso, y la conducta del extracto con alcohol absoluto. El extracto tenía un olor "espermático", era alcalino, y su residuo después de secado era pegajoso. Concluyeron que la mancha no podía haber sido hecha con grasa animal, y que era una mancha seminal.

En 1827, Orfila, que fue uno de los más respetados médico-legistas de la época, informó de una serie de tests químicos para la identificación de fluido

seminal. Había sido consultado en un caso en el que existía la sospecha de que una niña de 13 años había sido víctima de abusos sexuales. Un médico vio a la niña 9 días después y publicó un informe de sus hallazgos en el que daba a conocer su criterio acerca de que la niña había sido agredida sexualmente, basado en el hecho de que había recuperado semen de la vagina. Orfila objetó a estos hallazgos en dos planos: primero, al aseverar que era altamente improbable que el semen persistiese en la vagina de la víctima durante 9 días, especialmente después de que ella estuviera sufriendo una descarga de flujo; y segundo, que no habían sido utilizados métodos químicos sistemáticos para asegurar que la identificación del fluido seminal era correcta. Los tests que él ideó para la identificación de semen estaban basados en: la apariencia de las manchas, cambios de color y consistencia obtenidos mediante la acción del calor e inmersión en agua, olor emitido por la mancha humedecida, y la conducta del extracto acuoso frente a un número de reactivos y tratamientos. Las manchas seminales fueron comparadas, al seguir estos criterios, con un número de otros tipos de secreciones vaginales, y con manchas de mucus nasal y saliva. Orfila dijo en este trabajo que, mientras él no había tenido dificultad en encontrar espermatozoides en muestras seminales frescas, e incluso en una muestra de 18 años de semen seco, con la ayuda del microscopio, le faltó la confianza al emplear la técnica microscópica para manchas seminales en tejidos. Aseveró que era muy difícil, si no imposible, encontrar células intactas en extractos de manchas, y que los procedimientos químicos deberían ser empleados siempre.

En 1834, Chevallier, al informar de sus exámenes en un caso de agresión sexual, confirmó que los métodos empleados eran esencialmente los que habían sido descritos por Orfila. En 1839, Devergie, publicó un trabajo con los signos

de muerte por colgamiento, (1839a). Uno de los cuales era el hallazgo de espermatozoides en el canal uretral de la víctima, efectuado con examen microscópico. Aseguró que había encontrado células de esperma en manchas seminales de 10 meses, y afirmó que la confirmación de la presencia de espermatozoides en una mancha era un criterio más cierto para diagnóstico de manchas seminales que los métodos químicos. Orfila en 1839 discrepó con Devergie por una serie de motivos, y Devergie (1839b) le contestó oportunamente.

En 1837, Rattier había publicado un documento sugiriendo que las células de esperma podían ser identificadas en manchas seminales presentes en tejidos y *recomendado el correspondiente procedimiento para las investigaciones médico-legales*. Rattier aseguró haberse informado, a través del microscopista Charles Chevalier, acerca de los trabajos previos al asunto, y comprobó que Lebaillif había identificado una mancha seminal por detección microscópica de espermatozoides algunos años antes en el denominado caso *Contrafato*, aunque no lo había publicado. Chevalier mencionó este hecho indirectamente en su libro en 1839 y Florence en 1896 afirmó que Chevalier había llegado a los mismos resultados que Lassaigne en 1858.

En 1839, Bayard publicó un extenso documento acerca del uso del microscopio en el examen de manchas seminales para comprobar la presencia de espermatozoides. Otros procedimientos cuidadosos fueron detallados para realizar correctamente la técnica, y el método comenzó a ser generalmente aceptado poco después. Los primeros métodos químicos fueron gradualmente abandonados por muchos profesionales, aunque pese a ello los experimentos

para encontrar métodos no microscópicos para la diferenciación de manchas de fluido corporal, persisten todavía. Lassaigne, en 1858, señaló una serie de reactivos definidos para dar diferentes tipos de reacciones con manchas seminales y otras clases de manchas que podían asemejarlas. Brouardel revisó las técnicas para la identificación de manchas seminales en 1879, recomendando el microscopio como la técnica principal. No obstante, en ausencia de espermatozoides no se podía sacar la conclusión de que el semen estuviera ausente, porque era conocido el hecho de que un cierto número de hombres eran azoospermicos. En 1880, Boutmy y Brouardel fueron solicitados por la Sociedad de Medicina Legal para la evaluación de una técnica, que había sido propuesta por Petel y Labiche, para la identificación de manchas seminales. Petel y Labiche habían informado que muchos fluidos corporales y otras manchas tomaban color de la tinte carmín, pero éstos se decoloraban de forma diferente en solución de carbonato sódico. Las manchas seminales requerían 12 horas para decolorarse, mientras que otras manchas, que ellos habían estudiado, necesitaban mucho menos tiempo. Boutmy y Brouardel no pudieron aceptar el test como suficiente por sí mismo para la identificación, pero informaron que podía ser útil para proveer de evidencia adicional en algunos casos.

Ninguno de los tests no morfológicos usados durante la mayor parte del siglo XIX han sobrevivido. La mayoría de las autoridades empezaron a confiar más en la detección de células de espermatozoides para la identificación de manchas seminales alrededor de 1840. El test Florence para identificación de manchas seminales fue introducido en 1896.

MÉTODOS DE EVALUACIÓN

La identificación de células de esperma no es el método más antiguo para la identificación médico-legal de manchas seminales pero puede ser todavía el más seguro. Las técnicas son relativamente simples y el hallazgo de espermatozoides constituye una prueba indiscutible de que la mancha es de origen seminal. Durante mucho tiempo, hasta alrededor de 1900, no había realmente otros métodos seguros para identificar semen. Reese en 1891 enfatizó sobre este punto en su texto. Menger en 1887 dio un informe de un caso en San Antonio (Texas) en el que un hombre mayor era acusado de violar a un niño. En unas 30 placas preparadas de las manchas de la ropa interior de la víctima, sin embargo, no pudo encontrar células de esperma y dijo que no podía asegurar la presencia de semen.

Se han recomendado diversos procedimientos para la identificación de espermatozoides en manchas seminales. Todos pueden ser clasificados dentro de uno de los siguientes procedimientos, de acuerdo con Pollack en 1943. (1) separación de células del material o substrato provisto e identificación microscópica; (2) destrucción parcial o total del material provisto; y (3) identificación de células de esperma "in situ", casi siempre con varias manchas biológicas sometidas a tinción para proceder posteriormente a la identificación.

En 1987 Bolton y Thorpe comparan manchas de semen por un método de absorción elución (Elisa) facilitando la determinación de los grupos ABO.

FOSFATASA ÁCIDA SEMINAL (PROSTÁTICA)

Es conocido hace mucho tiempo que al semen le pueden faltar espermatozoides. Hay muchas diferentes razones para esta circunstancia, incluyendo defectos congénitos, patologías y vasectomía. El examen de evidencia física en casos de agresión sexual es más difícil en la identificación de semen que carece de espermatozoides. Durante muchos años, científicos forenses han estado interesados acerca de este problema, y se han ofrecido un cierto número de métodos como soluciones.

El test de la "fosfatasa ácida" es una de las técnicas mejor conocida y más ampliamente empleada para la identificación de semen, aparte de la *identificación de las células de esperma*. Se basa, en sus muchas variaciones, en la presencia en semen humano de altos niveles de concentración de una fosfohidrolasa no específica de origen prostático.

En 1935, Kutscher y Wohlbergs informaron que la eyaculación masculina contenía una enzima que hidrolizaba varios ésteres fosfato a un pH ácido óptimo. Los primeros estudios de Kutscher en 1935 de fosfatasas en orina habían impulsado la investigación. Su origen fue establecido como perteneciente a la glándula prostática y la enzima se llamó "fosfatasa prostática". El origen prostático de la enzima se confirmó por Gomori en 1941 usando técnicas de coloración histoquímicas.

En 1945, Lundquist, en Copenhagen, sugirió que las extraordinariamente elevadas cantidades de fosfatasa ácida prostática presentes en semen humano

podían usarse para la identificación de semen en situaciones médico-legales. Los estudios de esta posibilidad se llevaron a cabo en Dinamarca por Riisfeldt en 1964, Rasmussen en 1945 y Hansen en 1946.

Rasmussen no se refirió al documento de Lundquist, y aunque la publicación de su documento parece tener precedentes en el de Lundquist, sería correcto, por esta razón, acreditar el origen de la utilización médico-legal de fosfatasa ácida seminal como una técnica de identificación de semen a ambos investigadores. Rasmussen recomendó el test como de utilidad en la identificación de manchas seminales en medicina legal, especialmente en muestras azoospermicas.

Hansen en 1946 determinó la actividad de fosfatasa ácida en un número sustancial de muestras seminales, y de muestras de otras secreciones corporales. Las medidas se hicieron en líquidos donde las unidades de actividad podían fácilmente referirse a volumen, así como en manchas. En las manchas, las unidades de actividad eran referidas al área ocupada por la mancha con el fin de comparar diferentes materiales.

Se informó que solamente las secreciones prostáticas de hombre y mono contenían elevadas concentraciones de fosfatasa ácida, y que este test podía, por esta razón, ser de gran valor en la discriminación de semen animal si fuera necesario. Los valores exclusivos se atribuían a la identificación de semen azoospermico. Hansen informó de que la primera parte de la eyaculación era particularmente rica en fosfatasa ácida prostática. Esta fracción contenía una mínima cantidad de espermatozoides, aunque las últimas fracciones son más

ricas en células y tienen menos fosfatasa ácida. En exposiciones médico-legales, no se encontraron casos en los que el esperma estuviera presente, pero la fosfatasa ácida era negativa. Hansen manifestó que el test era específico para semen, pero no obstante recomendó que fuera usado en conjunción, y no como sustituto, con la búsqueda para su identificación de células de esperma.

El tercer estudio importante se llevó a cabo por el Dr. Ove Riisfeldt en 1946. Valores altos de actividad de fosfatasa ácida se encontraron en todas las eyaculaciones excepto en aquellos sujetos prostatomizados. Para manchas, Riisfeldt estaba convencido de que el método era específico de semen, y creyó que cuando daba resultados positivos, uno podía concluir con certeza que el semen estaba presente. Sin embargo, en los casos en que el test de fosfatasa ácida era negativo, la búsqueda de células tenía que intentarse. Si no se detectaba la enzima, y no se encontraban espermatozoides, la conclusión de ausencia de semen estaba garantizada.

En 1947, Kaye recomendó el test de fosfatasa ácida para identificación de manchas seminales. Manchas de fluido seminal contendrían un mínimo de 30 unidades King Armstrong de actividad de fosfatasa ácida, y cualquier mancha conteniendo ese nivel de actividad o más alto podía considerarse que era de origen seminal. Recomendó que se hiciera también una búsqueda de células de esperma. Manchas de hasta 6 meses dieron fuertes reacciones positivas. La única posibilidad de obtener un valor alto de fosfatasa ácida de otro fluido corporal sería en sueros de pacientes con metástasis de carcinoma de próstata. En 1936 Gutman y colaboradores observaron que la actividad de la fosfatasa ácida era elevada en pacientes con cáncer de próstata, entonces sugirieron que

las pruebas en suero de fosfatasa ácida podían ser útiles como ayuda en el diagnóstico de carcinoma de próstata, esta idea ganó rápidamente adeptos como por ejemplo en el año 1946 por Benotti y colaboradores. En 1951, Kaye informó de que manchas guardadas a temperatura ambiente durante 3 años todavía daban fuertes positivos al test de fosfatasa ácida.

En 1950, Lundquist revisó la experiencia del Instituto de la Universidad de Medicina- Legal de Copenhagen con el test de la fosfatasa ácida. Más de 2000 manchas correspondientes a 346 casos se examinaron en un período de varios años. Los exámenes cuidadosos para comprobar la presencia de espermatozoides fueron efectuados, en muchos de los casos, en adición al test de la fosfatasa ácida y se encontró que dicho test podía dar negativo aún cuando el esperma estuviera presente. Similarmente, el test era a veces positivo en ausencia de células de esperma. El test, no obstante, carece de valores útiles negativos, aunque Lundquist afirmó que los test de fosfatasa ácida controlados apropiadamente no dejaban duda acerca de la presencia de semen, incluso si no se encontraban células de esperma.

No todos los autores han estado de acuerdo en que un solo test de fosfatasa ácida positivo, en ausencia de otra evidencia, podría tomarse como prueba concluyente de la presencia de semen. Hauck y Lithoff en 1959 revisaron este asunto finalmente, concluyendo que un test de fosfatasa ácida solo no debería considerarse concluyente para la identificación de semen. Mostraron que un número variado de sustancias de origen vegetal daban altos valores de fosfatasa ácida. Kind en 1964 también revisó este test, y estuvo parcialmente de acuerdo con Hauck y Leithoff. Kind también discutió la reacción del test de

fosfatasa ácida como un instrumento de búsqueda para manchas seminales localizadas en prendas y superficies, y Fonzak en 1977 recomendó esta técnica como útil.

Un número de autores han definido los ensayos cuantitativos de fosfatasa ácida para determinaciones médico-legales de semen y manchas seminales, insistiendo en que es la elevada concentración de fosfatasa ácida y no su mera presencia la que caracteriza al plasma seminal. (Rasmussen en 1945; Kind en 1964; Nakamura y colaboradores en 1959; Kaye en 1947; Hazen en 1955; Walther y Höhn en 1971; Gómez y colaboradores en 1975; Davis y Gómez en 1975). Un número de autores que emplean ensayos cuantitativos han señalado valores "cut-off", en unidades por volumen o área; muestras que contienen valores de fosfatasa ácida en exceso a estos valores, deberían ser definitivamente considerados como de origen seminal. En muchos casos, estos valores han sido establecidos empíricamente a través de la medida del contenido en fosfatasa ácida en un gran número de sustancias, y seleccionar después aquellos valores por encima de los observados en todas las sustancias que no eran seminales.

Kind en 1964 dijo que él no aseguraría la presencia de semen en una mancha basándose solo en el test de la fosfatasa ácida, ya que sería necesaria la corroboración de la identificación mediante hallazgos de células de esperma, o con un test Florence positivo. Pinto en 1959 dejó constancia de que él presentaría el dato de un alto valor de fosfatasa ácida, bien en ausencia o en presencia de espermatozoides, con una adecuada explicación y dejar al demandante o a la autoridad judicial juzgar oportunamente. Schiff en 1978 discrepó de esta idea ya que pensó que el testigo experto daría una opinión de

nivel científico, la cual estimó que sería bastante compleja para que los no científicos fueran capaces de evaluarla apropiadamente. Revisó el test de fosfatasa ácida, y estaba convencido de su autenticidad como indicador de la presencia de semen, incluso en ausencia de esperma y preconizó la ejecución de un test cualitativo siempre en las manos de un profesional experimentado. Afirmó que si se usaba un test cuantitativo se requiere más tiempo y debe seleccionarse un punto "cut-off" arbitrario. Añadió que su experiencia con el test durante muchos años le había mostrado que era fiable para semen azoospermico.

En 1971 Gotfried por electroforesis separa dos isoenzimas permitiendo la diferenciación de la fosfatasa ácida en el semen humano.

Owen y Smalldon en 1975 incorporaron el resultado del significado evidente de los hallazgos del test de fosfatasa ácida positivo. En el examen de las chaquetas de 100 hombres, y 100 pares de pantalones de hombre seleccionados al azar en una tintorería, se informó que 44 pares de pantalones mostraban áreas de significada actividad de fosfatasa ácida y 37 de ellas eran suficientemente altas como para indicar un posible origen prostático.

Schiff en 1977 llega a la conclusión de la presencia de fosfatasa ácida en cien muestras de semen.

Duenhoelter, en 1978, en trescientos casos de violación, establece la correlación entre la detección de esperma y la fosfatasa ácida.

Rand en 1986 investiga la actividad de la 8GM por medio de la electroforesis en manchas seminales. Variando la actividad en el sedimento espermático, hay una diferencia de actividad entre el sedimento y el plasma seminal en la proporción de 1:0,3 a 1:4. Existiendo 100 millones de espermatozoides por mililitro de plasma seminal.

Baechtel en 1987 toma muestras "in situ" de la mancha en prendas de algodón, detectando la presencia de la actividad de la fosfatasa ácida prostática, determinando (SAP) por 5 bromo 4 cloro- 3 metal fosfato (BCIP).

PERMANENCIA DE FOSFATASA ÁCIDA. PERMANENCIA DE LA ENZIMA EN UNA MANCHA SEMINAL SECA.

Es evidente la importancia de la supervivencia de la actividad de la fosfatasa ácida en manchas en función del secado y del tiempo transcurrido. Faulds en 1951 estudió este asunto con detalle. Para ello preparaba y guardaba las manchas a diferentes temperaturas durante un cierto número de meses. En el transcurso de aproximadamente 5 meses, la actividad de la fosfatasa ácida en las manchas descendía como máximo un 78% y como mínimo un 48%. La disminución en actividad era de análoga magnitud en una mancha mantenida a -14° como en otra guardada a 37°. También observó que la actividad de fosfatasa ácida del semen podía alterarse en el 50 % en un simple secado. Pérez de Petinto en 1953 indicó que un semen conteniendo 2000 unidades de actividad/ml muestra solamente 90 unidades/cm² en 6 horas de envejecimiento. A los 3 meses, permanece una actividad de 20 - 25 unidades/cm². Kaye en 1951 mostró que manchas guardadas a temperatura ambiente durante 3 años

mantenían actividad. Kerck en 1972 indicó que manchas seminales guardadas a temperatura ambiente retenían actividad durante al menos 14 meses y dicha actividad podía mantenerse después de 4 años y medio si se almacenaban a -20°.

Hay que dejar claro que se ha utilizado un variado número de distintos substratos y técnicas de ensayo en los estudios de las fosfatasas, y que diferentes autores han hecho uso de muchas unidades de actividad diferentes. Naturalmente no es de esperar que la enzima exhiba la misma afinidad por todos los substratos, así como que la sensibilidad de los ensayos no ha de ser la misma. Muchas de las aparentes discrepancias en las estimaciones de la supervivencia de actividad enzimática pueden probablemente explicarse debido a que son ocasionadas por tal variedad. Además a menudo es imposible comparar los resultados de un autor con los de otro; incluso si se han usado unidades comparables, no son homologadas en material o sustancia que ha sido ensayado pese a la utilización de una metódica análoga.

MÉTODOS INMUNOLOGICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SEMEN.

En 1963 Coombs y colaboradores, prepararon antisuero de conejo con plasma seminal humano, que podía ser interpretado semen-específico por absorción con suero y con saliva hervida. El antisuero no reaccionaba cruzadamente con extractos de manchas de sudor, sangre o semen de varios animales. Había una débil reacción cruzada con semen de cerdo, que podía eliminarse por absorción. Este trabajo, que provocó un interés renovado en el

asunto, fue aparentemente inspirado por los estudios inmunolectroforéticos de Hermann en 1960 con plasma seminal humano, demostrando que mientras el semen compartía algunas proteínas en común con el suero, había un número de proteínas semino-específicas que también lo compartían. Mischler y Reineker en 1966 recomendaron el método inmunológico y pudieron demostrar que la reacción ocurría con extractos de mancha seminal, incluso después de que las manchas se hubieran lavado con agua jabonosa o caliente. Culliford en 1964 y 1967 confirmó muchos de los hallazgos de Coombs y colaboradores, afirmando la importancia de usar antisueros preparados contra el fluido corporal específico que uno quiere identificar en cualquier test de identificación inmunológico. También demostró que el test podía llevarse a cabo por métodos electroforéticos. El antisuero de semen humano, preparado por Coombs y colaboradores en 1963, podía tener una concentración tan alta como 1:8000 contra plasma seminal humano. Cernov en 1971 logró la preparación de un antisuero de semen humano en conejos que no reaccionaban cruzadamente con sangre capilar o menstrual, saliva, orina, mucus nasal, extracto de rábano o secreciones vaginales. Este suero era específico de la especie también. El problema de reacciones cruzadas con mucus vaginal es obviamente muy crítico si el antisuero se usa para la identificación de semen. Kerek en 1972 obtuvo reacciones inmunológicas positivas con extractos de mancha seminal después de almacenar las manchas a temperatura ambiente durante 14 meses y a -20° durante 4 años y medio. Thornton y Dillon en 1968 demostraron que el test inmunológico para el semen podía llevarse a cabo por inmunodifusión de membranas de acetato de celulosa. No se obtuvieron reacciones cruzadas por este sistema con sangre, saliva, orina o secreciones vaginales usando un antisuero de semen humano comercial. Tröger y Jungwirth en 1974 manifiestan

que la inmunolectroforesis es más sensible que la inmunodifusión (en geles), un antisuero ensayado por ellos detectaba diluciones 1:1500 de semen con aquella técnica, y solo 1:600 diluido por inmunodifusión. En 1963, Suyama y Sawada publicaron que habían preparado un anticuerpo de fosfatasa ácida antiseminal específico por inmunización de conejos con tejido prostático homogéneo con la consiguiente absorción con suero. El antisuero podía usarse para identificar manchas de hasta 4 años y 2 meses en un test de inmunodifusión, pero era negativo en una mancha de 9 años y 4 meses. El anticuerpo no reaccionaba con saliva, mucus nasal, orina o fosfatasas ácidas de plantas, pero si con suero de pacientes afectos de carcinoma prostático metastásico.

Hay que hacer notar que la mayoría de los procedimientos mencionados en las manifestaciones precedentes se basaban sobre sueros tomados contra el plasma seminal humano de fondo. Los estudios en la composición antigénica de semen humano han indicado que el fluido puede de hecho contener varias proteínas antigénicas específicas. Si una proteína plasma-específica seminal podía aislarse, y formarse antisueros específicos contra ella, las condiciones para la identificación estarían logradas.

OTROS TESTS INMUNOLOGICOS

Como asunto de interés histórico, debería tenerse en cuenta que un cierto número de investigadores examinaron la aplicabilidad de la anafilaxis como un método inmunológico para la detección y determinación de especies de plasma

seminal. Cualquier método basado en fenómenos inmunológicos podía adaptarse a las necesidades y requerimientos de tests médico-legales. Una vez que se ha comprobado que un antisuero exhibe especificidad apropiada, cualquiera de una variedad de métodos inmunológicos son capaces para detectar la reacción antígeno-anticuerpo, incluyendo precipitación, reacciones de aglutinación, fijación de complemento y anafilaxis. Las aplicaciones de todas estas técnicas se han empleado varias veces por varios investigadores. Más trabajo se ha llevado a cabo en determinación inmunológica de especies de origen de manchas de sangre que para cualquier otro propósito en inmunología forense. Por varias razones, muchos profesionales han preferido reacciones de precipitina para detectar reacciones antígeno-anticuerpo, y todavía se sigue haciendo.

En 1974 Owen y Smalldon publican un resumen de técnicas y de la marcha analítica en manchas de semen.

En 1982 Matsuzawa y colaboradores realizaron un método para la determinación inmunológica de semen empleando latex microtiter.

Samuel Baechtel en 1985 por una técnica de hemaglutinación inhibición establece la estabilidad y concentración de los grupos ABH en manchas de semen.

Craig y Scott en 1985 establecen la correlación existente entre grupos de manchas de sangre y manchas de semen, aunque siendo la correlación muy buena encuentran excepciones.

Scheithauer y Lötterle en 1986 establecen que la distribución de los grupos ABH en manchas de semen es más alta en la periferia de la mancha, empleando un método de absorción-inhibición.

Rand y colaboradores en 1986 establecen en manchas de sangre el sistema Km 1+: 15% y Km 3+: 98%.

Brinkmann y colaboradores en 1986 realizan la detección inmunohistoquímica de antígenos ABH en manchas de saliva, siendo la principal ventaja positiva la reacción de la tinción de la membrana celular por lo que se distingue de las reacciones falso positivas de bacterias. Es independiente del status secretor y se puede discriminar entre dos poblaciones celulares ABO (A y O).

Lötterle y Heine en 1986 realizan los grupos ABO por medio de inmunoperoxidasas.

Lincoln en 1986 comunica en una carta a su editor el hallazgo de la aparición de grupos ABO en poca cantidad dentro de la estabilidad de la mancha de semen.

Kamala en 1986 realiza en manchas una investigación preliminar en ABH, llegando a la conclusión que en manchas A y B se pierde el antígeno A a temperatura ambiente y por mas de 5 años y también que si estos se guardan húmedos se pierde el A de los grupos A y B.

TESTS CRISTALOGRÁFICOS.

Los tests cristalográficos fueron los primeros tests no morfológicos propuestos para semen cuya vigencia ha persistido hasta relativamente hace poco tiempo. El primer documento sobre el tema apareció en 1896, y los tests son todavía usados en algunos laboratorios. Algún número de modificaciones se han propuesto, y otros tests de este tipo, basados en diferentes constituyentes activos de plasma seminal, han sido publicados. El reportaje inicial de un test cristalográfico para semen estimuló en parte la actividad en la comunidad médico-legal, ansiosa de tener un test no morfológico digno de confianza a su disposición.

En 1895 y 1896, el Dr. Florence en Lyon publicó una serie de documentos refiriendo sus estudios en fluido seminal y su aplicación médico-legal. En el tercer documento, el ahora familiar test de Florence fue introducido y parece haberse considerado principalmente como un test presuntamente útil que ahorraría el tiempo requerido para concluir una búsqueda cuidadosa para células de esperma en cada mancha seminal sospechosa. El reactivo se prepara con 1.65 g de KI y 2.54 g de iodo en 30 ml de agua. Se comprobó que el test era bastante sensible y siempre se obtenía positividad con manchas seminales. Los cristales característicos que aparecían no se formaban a partir de mucus nasal, vaginal, orina, sudor, saliva, lágrimas, leche, fluido cerebral o descarga leucorreica, ni con varias muestras de semen animal ensayados. El componente seminal que daba origen a los cristales fue llamado

virispermina. Johnston en 1896 confirmó los resultados de Florence. En 1909 y 1910, Dervieux dijo que el test de Florence no tenía valor médico-legal, tanto si los resultados eran positivos como negativos.

De Dominicis en 1912 propuso una modificación del test. Pensó que este método era específico, y tenía valor médico-legal. En 1907, Lecha-Marzo dijo que el test no era específico para semen humano. Hektoen y McNally en 1923 consideraron que un test de Florence positivo podía entrañar una posibilidad, pero un test negativo indica la ausencia de semen inequívocamente. En 1939, Bagchi dejó constancia personal de haber observado muchos ejemplos de tests de Florence negativos con indudable presencia de semen, y que por lo tanto no podían ser extraídas consecuencias negativas al respecto. Sin embargo, creía que el test era específico de semen y que los resultados positivos eran prueba de la presencia de semen. Forbes en 1940 no estaba de acuerdo. Un resultado positivo era presunta evidencia y los resultados negativos no significaban necesariamente la ausencia de semen.

Takemoto en 1970 basándose en el método de Florence llegó un test personalizado de fosfatasa ácida.

Kerek en 1972 comunicó la ausencia de dificultades en obtener el test de Florence positivo en manchas que habían sido guardadas hasta 14 meses.

Debe hacerse notar que Kahane y colaboradores llevaron a efecto un número de estudios en la bioquímica, metabolismo y distribución tisular de colina. La colina seminal fue tratada por Kahane y Levy en 1937. Se dice que

el semen humano contiene de 11.2 a 14.4 mg de colina/100 ml de semen (Sangre y Otros Fluidos Corporales, 1961). Cualquier tejido o material biológico que tuviera concentraciones de colina suficientemente altas darían el test de Florence.

EL TEST BARBERIO

En 1905, Barberio en Nápoles publicó un test-cristal diferente para fluido seminal. Se notó que las propuestas originales presentadas por el Dr. Florence en su test de cristal no habían resistido el escrutinio experimental al que había sido sometido. El test Barberio empleaba una solución saturada de ácido pícrico. Podían obtenerse resultados positivos con semen, manchas seminales y material seminal parcialmente podrido. Mucus vaginal, mucus nasal y saliva no daban la reacción. Barberio pensó que la sustancia en semen responsable para la reacción era orgánica, se hallaba presente en plasma seminal, incluso en ejemplares azoospermicos, y era diferente de la sustancia reactiva en el test de Florence.

Cevidalli en 1906 propuso que el test fuera llevado a cabo con glicerina conteniendo soluciones saturadas de ácido pícrico en alcohol. No obtuvo los cristales con semen de perro, caballo o cerdo, y pensó que el principio activo en semen humano que reaccionaba con el reactivo podía ser protamina. Bokarius en 1907 uso ácido pícrico en soluciones de ácido cítrico conteniendo ácido acético glacial o ioduro de cadmio para el test. Posner en 1907 dijo que el test era específico para semen humano. Lecha-Marzo en su revisión de 1907 discutió el procedimiento de Barberio con algún detalle. Lo consideró preferible.

Littlejohn y Pirie en 1908 dijeron que en su experiencia el test había justificado ser específico para semen. El test podía, sin embargo, ser negativo en presencia de espermatozoides, pero estos resultados habían sido observados también en especímenes de orina, con diferente sensibilidad que en las seminales. Notaron que obtenían mejores resultados con el reactivo original que con la solución modificada por Cevidalli. Cuando era positivo, el resultado era considerado ser una mejor indicación de la presencia de semen que si se tratase de un test de Florence positivo. Dervieux en 1909 y 1910 dijo que no tenía confianza en un test cualquiera, indiferente de si los resultados obtenidos eran positivos o negativos. Lecha-Marzo volvió sobre el asunto otra vez en su revisión de 1918, e hizo notar que muchos otros fluidos corporales, incluyendo mucus vaginal y un número de extractos vegetales, daban resultados negativos.

Baecchi en 1913 sugirió que los cristales podían ser de picrato de espermina. Rosenhein en 1924 mencionó también que los cristales de Barberio eran de picrato de espermina.

TEST DE PURANEN

En 1936, Puranen propuso un test microquímico para semen usando ácido dinitronaftolsulfónico, o Naftol Amarillo S, como reactivo. Este compuesto, como el ácido pícrico, reacciona con espermina para formar cristales naranja característicos.

Berg en 1949 estudió la reacción en profundidad. Pensó que el test era seminal- específico pero no humano-específico.

MÉTODOS CROMATÓGRAFICO Y ELECTROFORÉTICO.

Los métodos cromatográfico y electroforético que se han propuesto como adecuados para identificar manchas seminales están basados en la separación e identificación de una o más sustancias de peso molecular más bajo encontrado en semen en concentraciones particularmente altas. En principio éstos son colina, espermina y espermidina.

En 1957, Fiori noto que la espermina y la espermidina podían separarse de manchas seminales por cromatografía en papel. Thomas y colaboradores en 1959 propusieron un procedimiento en el que la espermina era extraída con cloroformo. Con la fase de cloroformo se aplicaba una cromatografía de papel. Gültingen en 1961 estudió esta técnica y concluyó que era incierta. Levonen empleó cromatografía de papel en extractos de mancha seminal. Gültingen en 1961 dijo que él no pensaba que los métodos de cromatografía de papel fueran muy seguros. Djalalov en 1974 publicó un procedimiento cromatográfico de papel para separación y detección simultáneamente de espermina, colina, fosfatasa ácida y aminoácidos seminales.

Hessel y colaboradores en 1967, publicaron la detección de espermina y colina por cromatografía en capa fina. Yano en 1970 comunicó un método para la detección de espermina y colina por cromatografía en placa fina. No se encontró colina o espermina detectable en los jugos de un número de frutas. Hallcock en 1974 informó sobre un método similar al de Hessel y colaboradores en 1967.

Bures en 1968 uso electroforesis de papel para la separación de espermina y colina.

Kosatik y colaboradores en 1966, usaron cromatografía en papel para detectar ácido cítrico en la identificación de semen. Kirk ya había sugerido el posible uso de ácido cítrico como un marcador seminal en 1953.

Kirk en 1953 noto que cierto método cromatográfico en papel muy similar al que había sido descrito para separación en manchas de sangre era aplicable a la separación de sustancias en manchas seminales.

CREATINA FOSFOQUINASA

En 1964, Griffiths y Lehman sugirieron usando los altos niveles de creatina fosfoquinasa en semen como una base para la identificación médico-legal de manchas seminales.

De acuerdo con estos investigadores el semen contiene una concentración más alta que cualquier otro fluido corporal ensayado.

LA ISOENZIMA LACTICO DESHIDROGENASA

La presencia de actividad de LDH en semen humano fue comunicada en principio por Mc Leod y Wroblewski en 1958. En 1963, Blanco y Zinkhan

publicaron que habían observado una isoenzima LDH específica del esperma humano. La enzima no se encontraba en plasma seminal. Goldberg, en el mismo año, independientemente confirmó la observación. En 1967, Farriaux y colaboradores, aplicaron la nueva isoenzima, que había sido aplicada por sus descubridores, al diagnóstico de manchas seminales. Naturalmente el procedimiento carece de valor en el diagnóstico de muestras azoospermicas.

ESTERASAS DE ESPERMA Y SEMINAL

Esterasas no específicas en esperma fueron descritas por Beckman y Kjessler en 1968.

De gran interés para la identificación de mancha seminal eran las esterazas de plasma seminal. Tran Van Ky y Muller, 1968, llevaron a cabo un estudio claramente extenso de alguna de las enzimas en plasma seminal humano. En 1970, Darwiche y colaboradores, usando una variedad de método electroforético cruzado, ensayaron el método de identificación de esteraza con manchas seminales. Comprobaron que las enzimas eran relativamente termoestables. Hermann en 1972a describió una colinesterasa y una aliesterasa no específica en plasma seminal, ambas de las que eran detectables en complejos antígeno-anticuerpo seguido de inmunolectroforesis. Más tarde se aseveró que era de origen prostático.

OTROS METODOS

Dos marcadores enzimáticos adicionales se han sugerido como bases para

tests de identificación de manchas seminales. En 1948, Berg encontró que el semen y la sangre retroplacentaria contienen niveles mucho más altos de diaminaoxidasa que otros fluidos corporales. La diaminaoxidasa es una histaminasa y actúa sobre otros substratos que contienen grupos amino. Mostró que la enzima estaba presente en muestras azoospérmicas, y pensó que este sería un buen método para diagnóstico de manchas seminales. Puesto que la sangre presente en el nacimiento o en el aborto podía excluirse. Laves en 1948 ensayó hialuronidasa seminal, componente de la célula de espermatozoos, pero que podía encontrarse en plasma seminal en alguna extensión también. Pensó que esta enzima podía usarse como un marcador para semen en manchas en casos médico-legales. Ninguna de estas técnicas han sido extensamente usadas. Berg en 1954 las mencionó, y advirtió que los ensayos eran particularmente difíciles y complicados, y que la determinación de fosfatasa ácida es probablemente mejor aceptada por la mayoría de los profesionales.

Blake y Sensabaugh en 1976 realizan una revisión sobre marcadores genéticos, estableciendo la presencia de plasma seminal y espermatozoos en grupos ABO, Rh, MN, Lewis, Hl-A, T y ax(P). En 1978, junto con Grim, cuantifican los polimorfismos proteínicos, estableciendo marcadores genéticos en semen, comparando la actividad entre las enzimas con el espermatozoos y las células rojas.

Sutton en 1979 isoelectrofocusión establece nuevos alelos para la fosfoglucomutasa en semen, elevando el poder de discriminación cuando solo se detectaba por almidón.

Enos y Beyer en 1981 publican la importancia del examen de la piel y

pelos, en caso de violación dejados por el violador.

Parkin y colaboradores en 1981, estudia la peptidasa A en semen hallando el valor polimórfico en negros, los blancos poseen peptidasa A-1 en el cien por cien de los casos.

Stubbings y Newal en 1985 efectúan una valoración de la Gamma glutamil transpeptidasa y la P30, en los restos de secreciones de semen postcoital, evidenciando que la gamma glutamil transpeptidasa es no adecuada, y la P30 es totalmente específica en semen durante las seis primeras horas posteriores al coito vaginal.

Martín en 1986 comprobó que el ácido láctico presente está elevado a altos niveles en la secreción vaginal, mientras que el ácido cítrico es un buen indicador de secreción androgénica. En la mujer madura el ácido láctico proviene del exceso de glucógeno en las células epiteliales, mientras que en semen es mucho menor, teniendo por el contrario que el ácido cítrico, su concentración de semen es mucho mayor, pues es un activador de la fosfatasa ácida prostática. Para comprobar esto se usó isotachophoresis capilar que solo requiere pequeñas cantidades de muestra.

Estableció que el nivel de lactato es muy variable de 1-10 mM sin tener relación con las horas transcurridas después del coito, mientras que el nivel de citrato, así como la fosfatasa ácida, se afectan con el paso del tiempo.

Suzuki en 1981 establece por un método enzimático la presencia de colina en manchas de semen.

Noppinger en 1987 detecta la colina en el 85% de las manchas de semen, frente al 40% del test de Florence.

* INTRODUCCIÓN *

El estudio que vamos a exponer tiene como fundamento la formulación y consiguiente puesta a punto de un nuevo método analítico de dosificación de Zn en manchas de semen en telas, con el fin primordial de poder ser aplicado con la máxima fiabilidad en la identificación de dicha sustancia biológica en manchas presentes en prendas de ropa de vestir, pertenecientes a personas en las que sea necesario demostrar que han sido víctimas de posibles casos de violación.

Dada la escasez de datos al respecto, creemos firmemente que se trata de una metódica original, ya que en la literatura internacional no hemos encontrado antecedentes de estas características. El desarrollo pormenorizado del trabajo que hemos planteado y resuelto lo constituye un estudio completo y definitivo de las condiciones del método aludido, que consiste en una técnica de dosificación analítica de Zn mediante el empleo de la espectofotometría de Absorción Atómica, de marcada sencillez y fácil ejecución, que posibilita, a partir de las determinaciones analíticas del citado metal en ciertas manchas existentes en telas correspondientes a ropas de uso de personas que hayan podido sufrir actos de violación, comprobar y aseverar en función de los valores de Zn hallados, que dichas manchas pertenecen ciertamente a especies seminales, ya que solamente éstas pueden contener en su composición una cantidad de Zn susceptible de ser cuantificada con completa fiabilidad, lo que constituye un hecho mucho más problemático, caso de tratarse de otras especies biológicas, que pudieran ser las causantes del origen de la mancha, cuyas

concentraciones del elemento han de ser inferiores a las del semen. Por ello, la práctica especificidad del Zn en estas evaluaciones, inclusive frente a otros metales que forman parte relevante de la composición de dicha especie biológica y lo suficientemente importantes como para obligar a pensar de entrada en una posible y también sencilla dosificación (ejemplo: Mg y Ca), se pone de relieve de una forma evidente no sólo porque estos últimos elementos citados se hallan presentes también en aquellas otras sustancias biológicas que pudieran proporcionar las aludidas manchas, pero a concentraciones muy superiores en tales sustancias a las que se encuentra el Zn en las mismas, hecho que en principio parece ha de privarles de su calidad específica, ya que son diversas las especies biológicas capaces de proporcionar manchas de concentraciones mensurables en los metales indicados, aunque muchas veces superiores a las que puede suministrar el semen, hecho que detallaremos más adelante, sino porque en el desarrollo y realización de nuestro trabajo hemos podido comprobar experimentalmente que la concentración de ellos, presentes en la composición propia de las telas, llega a veces a alcanzar valores de magnitud suficiente para suministrar, al aplicar la metódica correspondiente para su determinación, unos blancos tales que pueden alterar notablemente o inclusive enmascarar el resultado analítico buscado, en la mayoría de las numerosas ocasiones en las que se ha efectuado dicha comprobación.

JUSTIFICACION E HIPOTESIS

Después de una larga experiencia en los análisis de semen, cercana a las 1.200 especies analizadas, fundamentalmente encaminada a las determinaciones de cinc y después de examinar profunda y detenidamente todos los antecedentes existentes en la literatura internacional acerca de los análisis de manchas de posibles casos de violación, en los que se determinaban sustancias componentes del semen como pruebas de convicción, se nos ocurrió pensar en la posibilidad de que tenía que haber alguna manera de identificar el semen, tenía que tener algo este fluido, alguna sustancia de su composición que en mayor o menor cuantía nos debía de dar su diferenciación respecto a los otros fluidos corporales.

La hipótesis estaba apoyada por la concentración de cinc que llevan las especies seminales, que es notablemente superior a la que poseen las diferentes sustancias orgánicas como la sangre, orina, etc. que también podían proporcionar manchas en tela en los casos de confrontación violenta, generalmente en las situaciones forzadas como las violaciones.

Esta hipótesis se ampliaba a otros metales también presentes en el semen como son el calcio y el magnesio, cuyos análisis en el semen nos habían otorgado la misma experiencia que la adquirida con el cinc, pero al realizar los análisis en las telas nos dimos cuenta que no daban los resultados satisfactorios que podíamos esperar.

Efectivamente, en primer lugar son las concentraciones de cinc en semen las que nos suministran en las manchas obtenidas unos valores discriminatorios tales, que frente a los encontrados en las otras especies biológicas que puedan originar manchas, mientras que las concentraciones de calcio y magnesio que pueda proporcionar el semen en las manchas, son en muchísimos casos inferiores a los que nos puedan suministrar orinas de concentración muy elevadas.

En una serie de análisis de calcio y de magnesio, en orinas realizadas durante estos años y superior a las mil determinaciones, nos permitió descubrir valores de concentración muy superiores a los que ha de proporcionar el semen, lo que invalida la especificidad de los análisis de estos dos metales.

Desde otro punto de vista, está la presencia de los metales de las telas manchadas, la cual puede y de hecho así ocurre, que enmascara el resultado analítico. En la práctica totalidad de los ensayos llevados a efecto por nosotros a lo largo de estos años que ha durado el trabajo experimental de esta tesis, hemos podido comprobar con estos dos metales, el calcio y el magnesio, que su presencia en las telas analizadas (catorce tipos de tela) era superior en tal grado que anulaba el valor hallado en la mancha.

Esto con el cinc no ocurre, puesto que a pesar de este metal está presente en la composición de las telas, siempre y como hemos comprobado en todas nuestras determinaciones ha sido inferior al determinado en la mancha, lo que nos ha obligado a prescindir de aquellos metales por imposibilidad de obtención de las pruebas necesarias.

Respecto a otras sustancias como la sangre o inclusive el agua sus concentraciones, como en su momento comprobamos, tampoco pueden competir con el cinc.

En el desarrollo del trabajo se comprobó también el efecto de la composición y textura de la tela frente a la obtención de la mancha y también a su efecto en el momento de analizarla. Esto se verificó cuando se obtuvieron las manchas, ya que en unas se conseguían rápidamente, mientras que en las otras era necesario la utilización de mayor tiempo para su consecución.

Las muestras de semen utilizadas para manchar las telas se obtuvieron de igual forma que las utilizadas en los servicios de andrología, para los análisis rutinarios de la composición de la especie seminal a estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

(I) Instrumentación.-

Todo el trabajo experimental se ha llevado a efecto con el empleo de un equipo instrumental suministrado por la firma PERKIN-ELMER, formado por un espectrofotómetro de absorción atómica modelo 1100, con corrector de absorción de fondo de arco de deuterio incorporado, sistema de atomización convencional de llama e impresora para recogida de datos EPSON FX-85.

Las condiciones operatorias del equipo instrumental aparecen consignadas en la TABLA 1.

(II) Pinzas de Hartmann.-

Pinzas nasales cortantes de 5 mm. de diámetro (Medicon Instruments, referencia 663201). Se han utilizado para cortar círculos de tela cuyo área ha de ser el valor de referencia conocido para efectuar los cálculos obligados.⁽¹⁾

(1) Todo nuestro trabajo se ha realizado con círculos de tela obtenidos con las pinzas consignadas y los cálculos están basados en los valores de área proporcionados por ellos.

Aquellos profesionales que deseen aplicar nuestro método, por motivo personal o por imperativos de su trabajo, pueden correctamente, si lo estiman oportuno, utilizar pinzas que permitan obtener círculos de mayor superficie; ahora bien, es condición indispensable que efectúen siempre los necesarios ensayos previos de comprobación del método.

Existen en el mercado pinzas nasales cortantes de la misma firma comercial con diámetros superiores (7, 9 y 11 mm). En el apartado referido a los cálculos consignamos el valor medio de los valores correspondientes a las áreas de los círculos que se obtienen con el empleo de las pinzas utilizadas y recomendadas por nosotros, así como la forma de determinarlo.

También y como hemos demostrado en el presente trabajo, puede emplearse más de un círculo para cada determinación analítica.

Es condición indispensable que este valor sea establecido siempre con la máxima exactitud antes de proceder a la ejecución del método, para ser luego aplicado de forma continua y sistemática. Es evidente que cuando sea necesaria la sustitución de unas pinzas usadas por otras nuevas, deberá volverse a establecer el correspondiente valor de referencia, con idénticas exigencias.

Caso de utilizar pinzas que posean mayor diámetro, y con anterioridad a la realización de los correspondientes estudios de comprobación y puesta a punto del método de la forma recomendada por nosotros en el presente trabajo habrá de realizarse evidentemente una cuidadosa evaluación del valor numérico del área del círculo que se obtiene al cortar la mancha de tela para analizar.

(III) Reactivos.-

- a) H_2SO_4 concentrado (Merck Suprapur. referencia 714).
- b) HNO_3 concentrado (Merck Suprapur. referencia 441).
- c) Solución patrón de Zn concentrada. Solución de Zn de 1mg/ml en HNO_3 diluido. (Fisher, referencia SZ13-500).
- d) Solución patrón de Zn diluida. Solución de Zn de 10 $\mu g/ml$ preparada a partir de la solución (c) mediante dilución acuosa conveniente.
- e) Soluciones patrón de trabajo. Soluciones de Zn de 0.200, 0.500, 1.000 $\mu g/ml$, obtenidas por dilución acuosa de la solución (d).

El agua empleada en el presente estudio, tanto para la preparación de los reactivos como para el lavado del material de trabajo utilizado, ha sido agua Milli-Q (referencia ZFMQ 230 04) Millipore.

(IV) Material de Trabajo.-

- a) Todo el material utilizado en el presente trabajo para la recogida y preparación de las muestras, así como para su almacenamiento en caso de necesidad de retrasar el análisis, (matraces, pipetas, tubos de ensayo, etc), ha sido de vidrio neutro (para ataques ácidos) o de plástico desechable, lavado con ácido nítrico diluido y/o solución acuosa detergente (Tritón X 100, al 0,5 %) y enjuagado sucesivas veces con agua hasta hallarse totalmente libre de Zn.

- b) Las muestras a investigar han sido seleccionadas entre prendas de ropa de diversa calidad y textura, manchadas con semen, así como con otras sustancias biológicas (sangre, orina) cuyas manchas han de contener el elemento en diferentes cantidades y también con soluciones de distintas concentraciones conocidas de Zn, con el fin de poder, en primer lugar, proceder al estudio completo del desarrollo y formulación correctos del método analítico que se ha de emplear, pieza fundamental del presente trabajo, para una vez establecido y puesto a punto definitivamente pasar, mediante una serie completa de análisis de comprobación del mismo a través de su ejecución en todos aquellos casos que se puedan presentar en el momento de su futura aplicación, a culminar finalmente con el examen global de la totalidad de los datos obtenidos y las

conclusiones oportunas que de ellos puedan deducirse.

(V) Procedimiento analítico.-

a) Preparación de las muestras

A partir de la tela manchada y en la zona interior de la mancha seleccionada se verifica la toma de la correspondiente muestra mediante el corte de un círculo con las pinzas de Hartmann cortantes (II); este círculo se deposita en un tubo de vidrio graduado, y su análisis final nos proporcionará el contenido de Zn en la sustancia que mancha la tela más el contenido del metal en ésta. Después y de la misma tela, pero en una zona alejada de la mancha, que esté completamente limpia, se corta con las pinzas otro círculo, que se deposita también en otro tubo graduado; el análisis de este último nos dará el valor del blanco, esto es el contenido de Zn en la tela, y que habrá que sustraer del valor anterior obtenido; la diferencia entre ambos nos dará la cifra correspondiente a la cantidad de Zn presente en la sustancia que ha producido la mancha. Una vez depositados los círculos en los tubos correspondientes, se le añaden a cada uno de ellos cuidadosamente 0.4 ml de H_2SO_4 concentrado (III-a) y se espera hasta que se impregne bien el círculo, para después adicionar 0.6 ml de HNO_3 concentrado (III-b); se deja estar unos minutos y se someten a continuación a una calefacción relativamente suave, al mantenerlos a una temperatura entre $60^\circ C$ y $70^\circ C$ durante 1 hora, ó más tiempo si fuera necesario, con el fin de obtener una disolución completa de la muestra.

Durante este proceso, conviene mantener una vigilancia discreta de su

desarrollo para evitar cualquier ataque turbulento o cualquier proyección que permitan originar pérdidas de la misma. Una vez conseguida la total solubilización de la muestra se deja estar hasta alcanzar la temperatura ambiente, y acto seguido se adiciona agua a cada tubo hasta un volumen final de 4 ml. A partir de estas últimas soluciones, que denominaremos soluciones de ataque, se procede a la dosificación analítica de Zn en ellas.

b) Análisis

Fijadas las condiciones de trabajo del equipo instrumental consignadas en la Tabla 1, se construye la correspondiente gráfica de calibración con el empleo de las soluciones patrón de trabajo (III-e), al ser aspiradas en la llama. Establecida aquella, se pasa a continuación a procesar las diferentes muestras ya preparadas, para que una vez recogidos los datos analíticos proporcionados por las mismas se proceda a la realización de los cálculos oportunos que a continuación se detallan:

$$C_s = C_{tm} - C_t \quad (I)$$

donde:

C_s: Concentración de Zn en la solución de ataque de la muestra de la mancha, correspondiente solo al contenido del metal existente en la especie, medido en $\mu\text{g/ml}$. ⁽²⁾

(2) Misma solución.

C_{tm} : Concentración total de Zn en la solución de ataque de la muestra de la mancha, correspondiente al contenido del metal de la especie más el Zn de la tela, medido en $\mu\text{g/ml}$.

C_t : Concentración de Zn en la solución de ataque de la muestra de la tela solamente, medido en $\mu\text{g/ml}$, que es igual al blanco.

A partir del valor C_s obtendremos el valor de concentración del metal en la mancha de la tela, procedente de la especie exclusivamente, al aplicar la siguiente fórmula:

$$C_m = \frac{1}{a} V \cdot C_s \quad (\text{II})$$

en la que:

C_m : Concentración de Zn en la mancha, medido en $\mu\text{g/cm}^2$ (concentración de Zn exógeno, procedente exclusivamente de la especie que ha dado origen a la mancha).

C_s : Concentración de Zn de la solución de ataque una vez corregido el blanco, medido en $\mu\text{g/ml}$. ⁽²⁾

(2)

Misma solución.

V: Volumen final de la solución preparada para analizar, medida en ml.

a: Area de la superficie del círculo de tela analizado, medida en cm^2 .

La fórmula (II) representa las condiciones generales de aplicabilidad para cualquier valor de a y V , cuya elección y posterior comprobación pueden ser optativas.

En el presente trabajo, en función de los valores de a y V que hemos seleccionado:

$$a = 0.192 \text{ cm}^2 \text{ (3)}$$

$$V = 4 \text{ ml}$$

(3) Para la obtención del valor de a , se ha seguido el siguiente criterio: Se han cortado 15 círculos diferentes y se ha determinado de forma independiente el área de cada uno de ellos. El cálculo del valor de dichas áreas se ha llevado a efecto con el empleo de un analizador de imágenes IBAS KONTRON, especialmente diseñado para medir dimensiones espaciales. Es evidente que cualquier método que se utilice para realizar tales mediciones cuyos datos sean de probada exactitud puede ser aplicado. Posteriormente mediante el cálculo estadístico correspondiente, se ha hallado el valor medio del área de todas las superficies cortadas; obteniendo los siguientes datos estadísticos:

Valor medio = 19.1714 mm^2
Desviación estándar = 1.5087 mm^2
Coeficiente de variación = 7.8693%
Error estándar medio = 0.4032%
Intervalo de confianza ($p < 0.05$) para la media:
 18.3811 ----- 19.9617
Expresado en cm^2 , el valor seleccionado nos queda:
 $a = 0.192 \text{ cm}^2$
 $ds = 0.015 \text{ cm}^2$
 $1/a = 5.208 \text{ cm}^2 \text{ (I)}$

que llevado a la fórmula (II) nos da la fórmula (III).

Hemos de hacer hincapié aquí pese a caer en la reiteración, que todo aquel profesional que vaya a aplicar el método, una vez que haya adquirido las pinzas cortantes que vaya a utilizar, deberá hallar, bien a través de un seguimiento de las pautas que nosotros hemos dejado consignadas, bien mediante el propio criterio que estime correcto, el valor medio del área del círculo que se obtiene con sus pinzas, para que a partir de dicho dato poder efectuar los cálculos oportunos de forma sistemática.

la fórmula (II) queda:

$$C_m = 20.83 C_s \quad (III)$$

RESULTADOS (MÉTODO)

Los resultados que a continuación se consignan y que aparecen en las figuras comprendidas entre la: 1a y 1b hasta la 12 y en las tablas desde la: 2 hasta la 13, todas inclusive, constituyen la selección de los datos más representativos del trabajo y por ello los hemos considerado suficientes para expresar una significativa síntesis de la totalidad del mismo.

DISCUSIÓN (MÉTODO)

Para establecer la metódica analítica que previamente se ha detallado ha sido necesario seguir con meticulosidad todos los pasos sucesivos que se requieren para la correcta formulación de un nuevo método de análisis, esto es, un estudio completo de los distintos factores que han de influir en su ejecución, a través de todas y cada una de las diferentes etapas que en conjunto lo han de constituir, y que van desde el momento en que se verifica la toma de muestra hasta su culminación con la obtención del dato analítico y el correspondiente cálculo del resultado final.

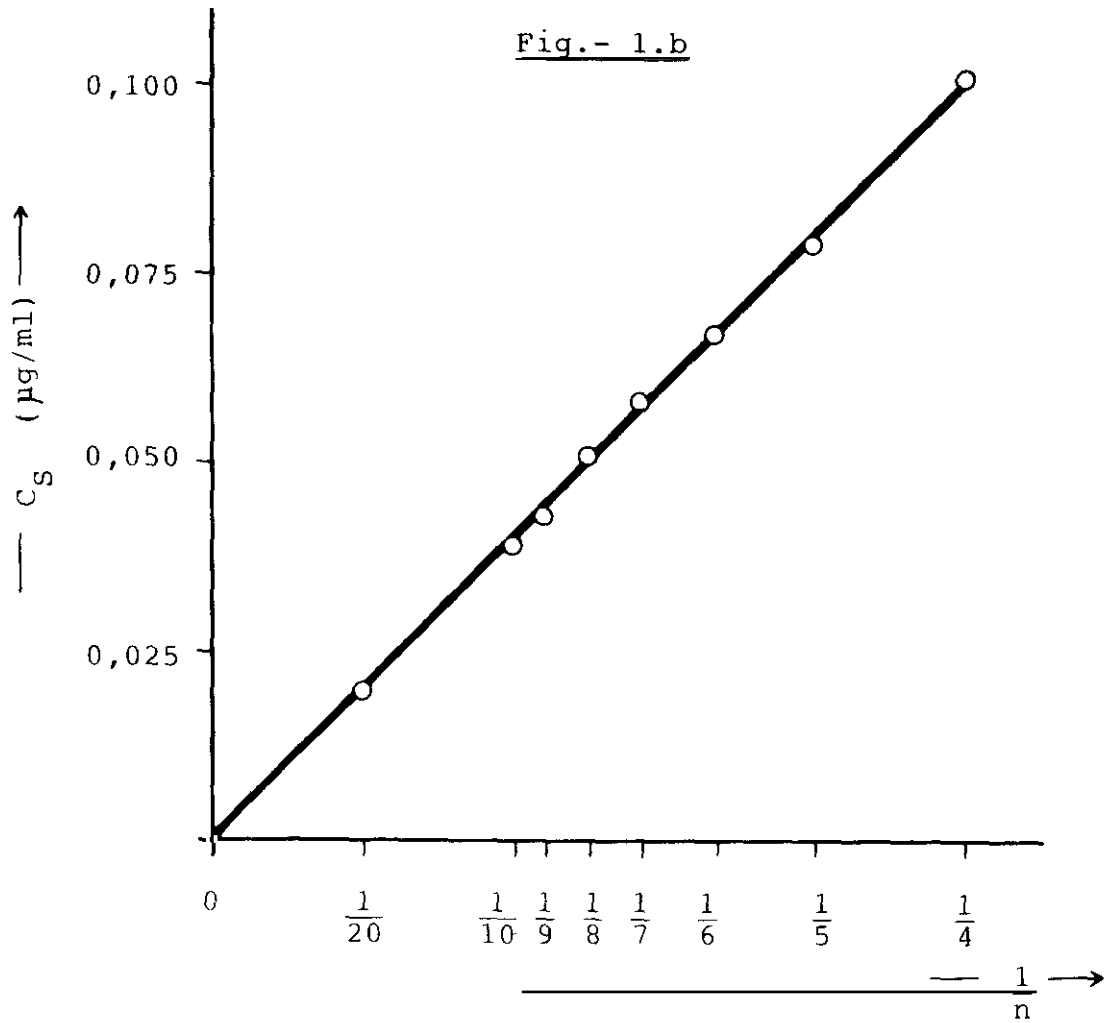
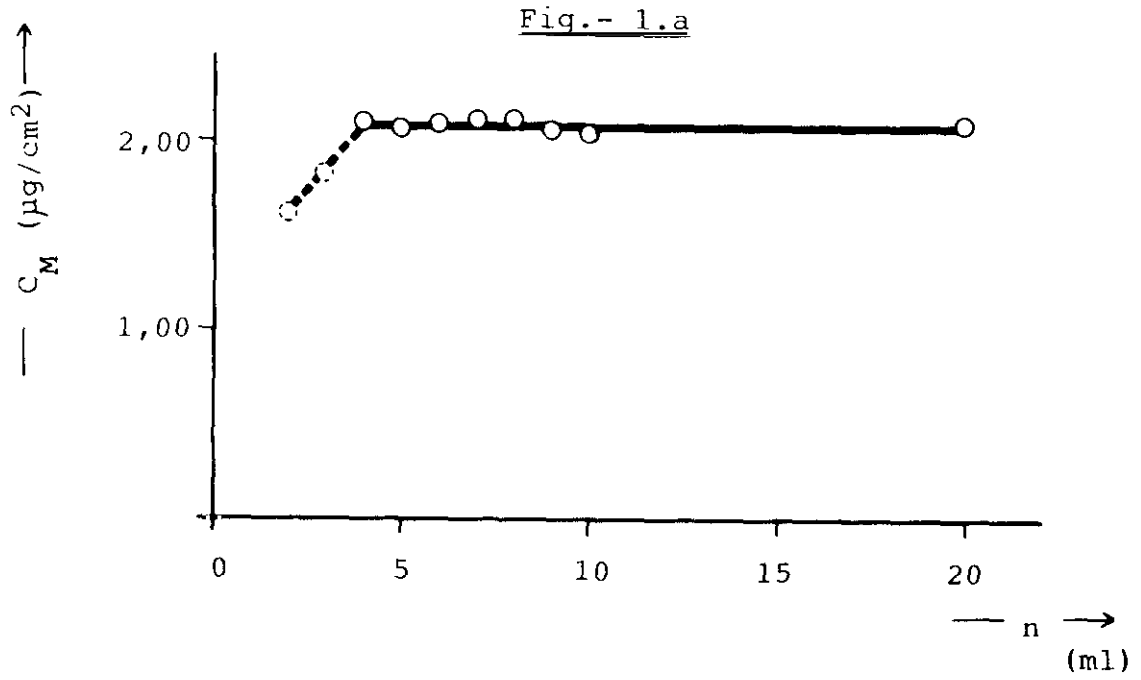
siempre es casi un deber recordar, entraremos a repasar con detalle todo el proceso experimental elaborado y su desarrollo correspondiente.

En primer lugar, comenzaremos con el comentario acerca del paso inicial: La toma de muestra. Para ello era fundamental seleccionar la forma de que fuera lo más exacta exigible: Con la utilización de las pinzas nasales cortantes, para la obtención de círculos en la tela manchada, que proporcionan una fácil y ciertamente repetible técnica de toma, que ha de suponer por ello el tener una franca aceptabilidad, creemos haber encontrado una solución ingeniosa y práctica, muy superior a otros sistemas empleados (ej: utilización de fracciones de hilos, etc.).

Una vez establecida la opción mencionada, la siguiente etapa ha sido conseguir la correspondiente solubilización de la muestra, condición imprescindible para continuar con las operaciones posteriores. Se han ensayado diversos procedimientos de ataque, con el empleo de diferentes ácidos oxidantes, para la necesaria destrucción de la materia orgánica (tela y sustancia biológica generadora de la mancha) y el método más sencillo, rápido y eficaz que se ha podido conseguir, es el descrito con el empleo de los dos ácidos mencionados (sulfúrico y nítrico) que nos permite una disolución del círculo en unas condiciones de poca complejidad operatoria. La utilización de los dos ácidos, así como la calefacción aplicada ha sido obligatoria, ya que algunas telas no podían destruirse con el empleo de uno sólo de los reactivos, aún con aplicación de calor.

Una vez conseguida la disolución de la muestra, ha sido necesario determinar la dilución a la que habría de llevarse, tanto para poder trabajar en un orden de concentración que permitiese obtener datos de toda fiabilidad, así como para eliminar el efecto concomitante de los posibles agentes interferentes presentes en la muestra (ácidos empleados, residuo inorgánico, etc).

En las figuras 1a y 1b, así como en la tabla 2, queda perfectamente demostrado que en la solución obtenida a partir del círculo disuelto, llevada hasta un volumen final de 4 ml o superior a éste, no existen acciones interferentes por parte del resto de sustancias presentes en la muestra que puedan modificar el resultado analítico; es evidente pues que la dilución a seleccionar puede ser elegida libremente por el analista, si bien ha de tenerse en cuenta de forma ponderada el efecto de la dilución sobre la precisión de las mediciones, cuyo estudio aparece reflejado en la curva de precisión representada en la figura 2. En función de todo ello, nosotros hemos realizado definitivamente todas las mediciones con el apoyo de los datos de este primer estudio y es lo que recomendamos preferentemente en la sistemática a seguir, esto es, verificar la aspiración en la llama con el empleo de un volumen final de la solución de ataque de 4 ml.



Diluciones diferentes $n = \text{vol. final (ml)}$

TABLA 2

Valores de Zn en manchas de semen en tela. (*)
Muestras atacadas y llevadas a volúmenes finales diferentes.

Muestra	Dilución 1/n (**)	Conc. de Zn en sol. de ataque ($\mu\text{g/ml}$) = Cs (***)	Conc. inicial de Zn en la superficie analizada (μg) Co = n.Cs	Conc. de Zn en la mancha ($\mu\text{g/cm}^2$) = Cm = Co/a = 5.21 Co
1	1/20	0.020	0.400	2.08
2	1/10	0.039	0.390	2.03
3	1/9	0.044	0.396	2.06
4	1/8	0.051	0.408	2.13
5	1/7	0.058	0.406	2.12
6	1/6	0.067	0.402	2.09
7	1/5	0.079	0.395	2.06
8	1/4	0.101	0.404	2.10
9	1/3	0.117	0.351	1.83
10	1/2	0.156	0.312	1.63

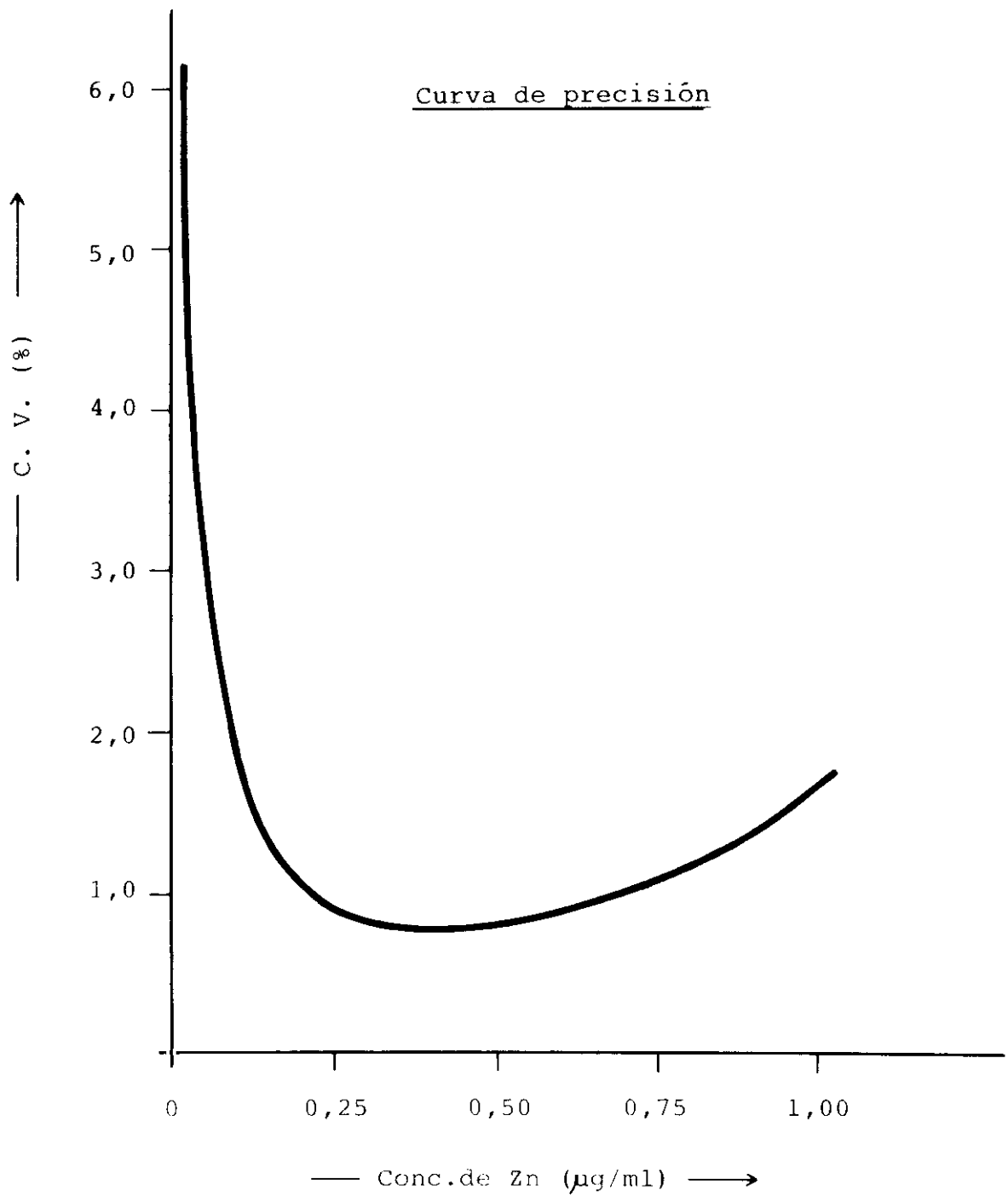
(*).- Misma mancha en misma tela.

(**).- $n = n^0$ de ml de volumen final.

(***).- Estos valores ya llevan efectuada la corrección del blanco.

(****).- $C_m \pm d.s = 2.08 \pm 0.03$; para valores de $n \geq 4$ el método es aplicable; para valores de $n < 4$ no lo es.

Fig. 2



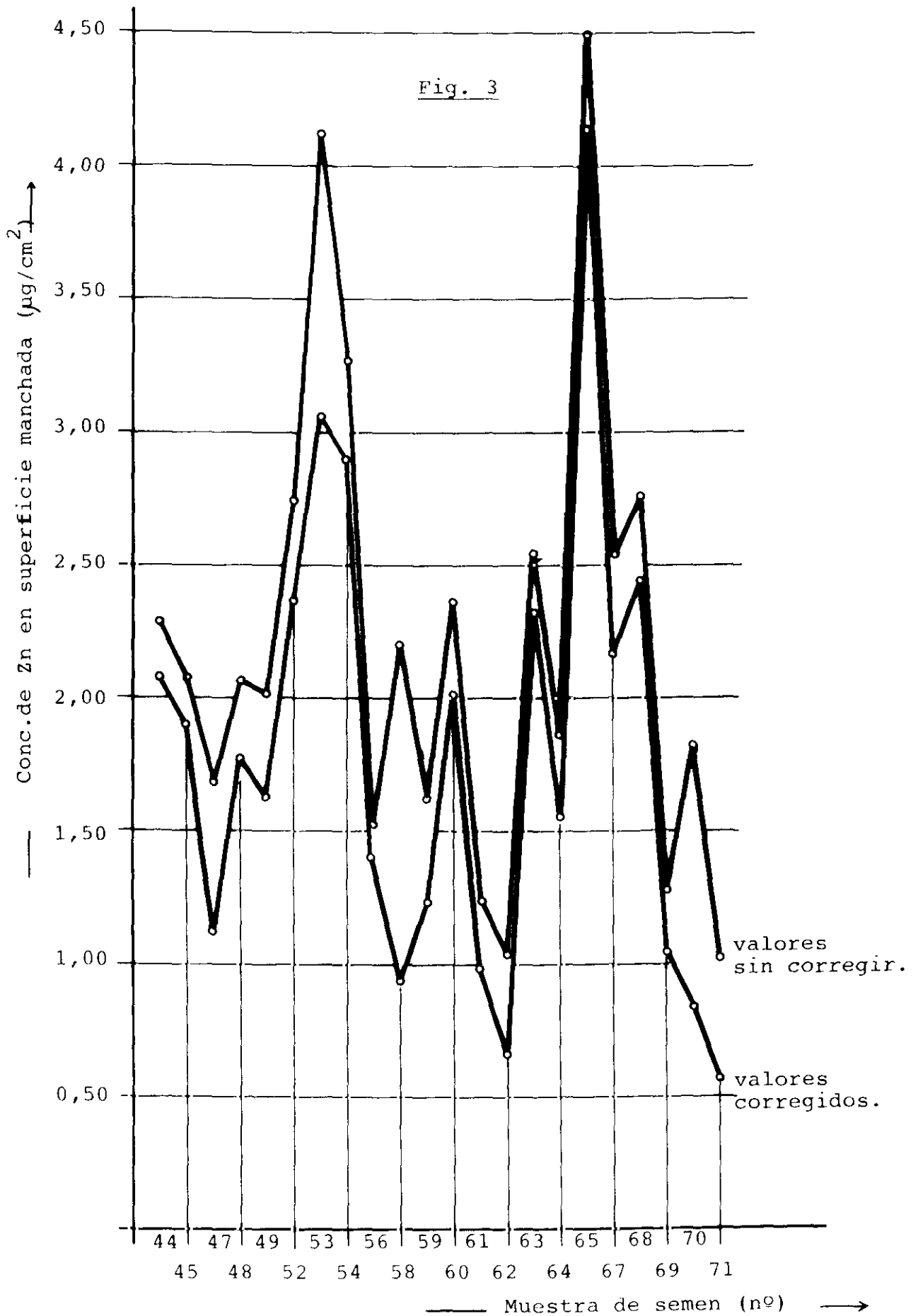
Tanto en la tabla 3 como en la figura 3 puede observarse con claridad la necesidad de efectuar la corrección del blanco correspondiente. En la comprobación de tal necesidad se puede apreciar que en la variación del resultado a obtener, caso de no realizarse la citada corrección, existe la posibilidad de superar la cantidad correspondiente al nivel de concentración verdadero en valores que van desde un 7.2% hasta un 133.0% en exceso.

En la tabla 4, independientemente del estudio previo de la precisión ya consignado (Figura 2), se pone de relieve una vez más la correcta repetibilidad de método. Los datos presentados en ella se han obtenido mediante la siguiente experiencia: A partir de 16 especies diferentes de semen se han efectuado las correspondientes manchas en una misma tela; de cada mancha se han tomado 3 círculos diferentes, que se han analizado cada uno de forma independiente; como puede apreciarse, los valores hallados para el contenido de Zn en la mancha de cada uno de los círculos, correspondientes a la misma especie, poseen una evidente similitud.

Otra experiencia de gran interés es la plasmada en la figura 4 donde presentamos unos resultados obtenidos con manchas sobre 6 telas diferentes. De cada mancha se han tomado sucesivamente 1, 2 y 3 círculos, que se han depositado en esas condiciones en 3 tubos diferentes, conteniendo cada tubo los 1, 2 y 3 círculos respectivamente. Realizado todo el proceso analítico y hallados los resultados correspondientes, al representarlos en la forma que aparecen en dicha figura, podemos comprobar lo que esta experiencia nos demuestra, esto es, que los resultados hallados guardan entre sí el mismo factor de proporcionalidad que las cantidades de muestra tomadas.

TABLA 3

Valores de concentración de Zn en manchas de diferentes especies de semen en distintas telas. Efecto de la concentración del metal procedente de éstas.							
Semen	Conc. de Zn. en sol. de ataque ($\mu\text{g/ml.}$)	Conc. de Zn en tela sin manchar -BCO- ($\mu\text{g/ml.}$)	Diferencia ($\mu\text{g/ml.}$)	Conc. de Zn en superficie manchada		% de variación en exceso	
				Valor sin corregir bco. ($\mu\text{g/cm}^2$)	Valor corregido ($\mu\text{g/cm}^2$)		
44	0.110	0.010	0.100	2.29	2.08	10.1	
45	0.099	0.008	0.091	2.07	1.90	8.9	
47	0.081	0.027	0.054	1.69	1.12	51.0	
48	0.099	0.014	0.085	2.07	1.77	16.9	
49	0.097	0.019	0.078	2.02	1.62	24.7	
52	0.132	0.018	0.114	2.75	2.37	16.0	
53	0.198	0.051	0.147	4.12	3.06	34.6	
54	0.157	0.018	0.139	3.27	2.90	18.8	
56	0.074	0.007	0.067	1.54	1.40	10.1	
58	0.105	0.060	0.045	2.19	0.94	133.0	
59	0.078	0.019	0.059	1.62	1.23	31.7	
60	0.114	0.017	0.097	2.37	2.02	17.3	
61	0.059	0.012	0.047	1.23	0.98	25.5	
62	0.049	0.018	0.031	1.02	0.65	56.9	
63	0.122	0.010	0.112	2.54	2.33	9.0	
64	0.090	0.015	0.075	1.87	1.56	19.9	
65	0.214	0.015	0.199	4.45	4.15	7.2	
67	0.122	0.018	0.104	2.54	2.17	17.1	
68	0.132	0.015	0.117	2.75	2.44	12.7	
69	0.061	0.011	0.040	1.27	1.04	22.1	
70	0.088	0.048	0.040	1.83	0.83	120.5	
71	0.049	0.022	0.027	1.02	0.56	82.1	



Valores de la concentración de Zn en area de manchas con y sin corrección del blanco.

TABLA 4

Manchas de semen (distintas especies) en la misma tela. (*)

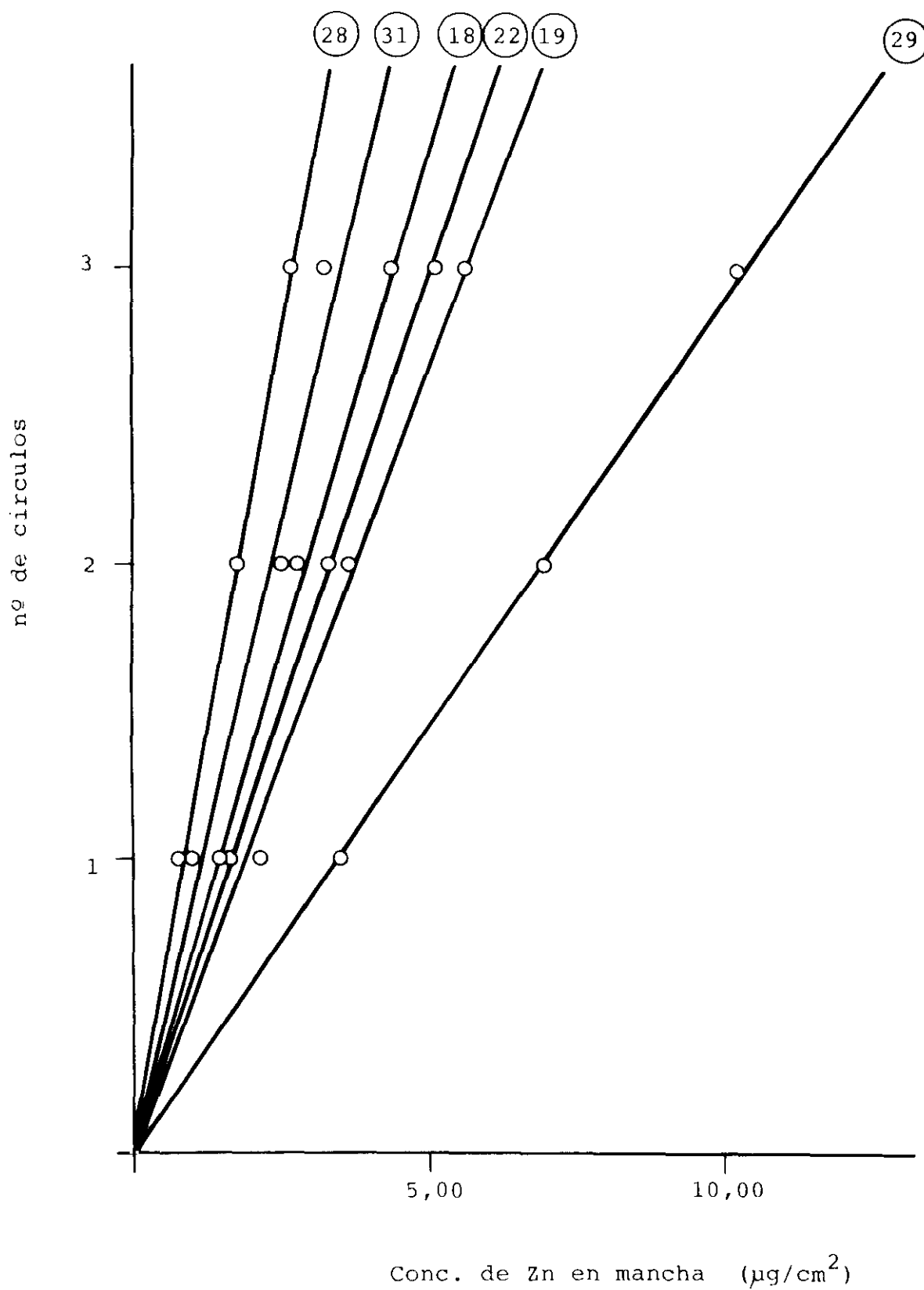
Tres tomas (3 círculos) de muestra diferentes de cada una de las manchas, preparadas y analizadas independientemente. ()**

Semen (nº)	Zn en mancha ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			Semen (nº)	Zn en mancha ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		
	Toma 1	Toma 2	Toma 3		Toma 1	Toma 2	Toma 3
44	2.21	2.19	2.10	53	1.67	1.83	1.73
45	2.19	2.15	2.12	54	0.67	0.65	0.67
47	1.71	1.77	1.77	55	0.77	0.75	0.71
48	2.12	2.02	2.12	56	1.17	1.21	1.23
49	1.29	1.27	1.23	58	0.98	1.12	0.83
50	1.92	1.94	1.98	59	1.15	1.24	1.19
51	0.92	0.99	1.04	60	1.04	1.17	1.12
52	1.79	1.67	1.69	61	0.71	0.74	0.71

(*) Repetibilidad

(**) En todos los análisis se ha verificado la corrección del blanco.

Fig. 4



Ello puede servir de base en el futuro y como ya hemos indicado anteriormente al describir el método, para efectuar las determinaciones con tomas de muestra cuyas circunferencias tengan un diámetro superior a las utilizadas por nosotros o bien, utilizar un número de círculos iguales superior a la unidad. Evidentemente, en paralelo se han verificado las correspondientes determinaciones de los blancos con los 1, 2 y 3 círculos correspondientes a cada lote.

En una serie de figuras que se incluyen a continuación (figuras 5, 6, 7 y 8) y que todas ellas presentan analogía, aparecen reflejados los resultados obtenidos a partir de un conjunto de ensayos, realizados con una serie de criterios que hemos considerado necesarios y procederemos a dejar expuestos: En la figura 5, se presentan los datos que se obtienen a partir de los resultados del análisis de diferentes círculos tomados de varias manchas conseguidas al manchar una tela con diversas muestras de un mismo semen, al que se le han realizado una serie de adiciones de cantidades conocidas de Zn. Como puede apreciarse, existe una total recuperación de las cantidades añadidas, lo cual, además de constituir una base de sustentación para confirmar la exactitud del método, nos hizo especular acerca de la posibilidad de que se pudiera evaluar la concentración de Zn en la especie seminal originaria de la mancha, a través de los valores hallados en ésta última, más una serie de ellos obtenidos al manchar nosotros la tela con soluciones conocidas de Zn.

Fig. 5

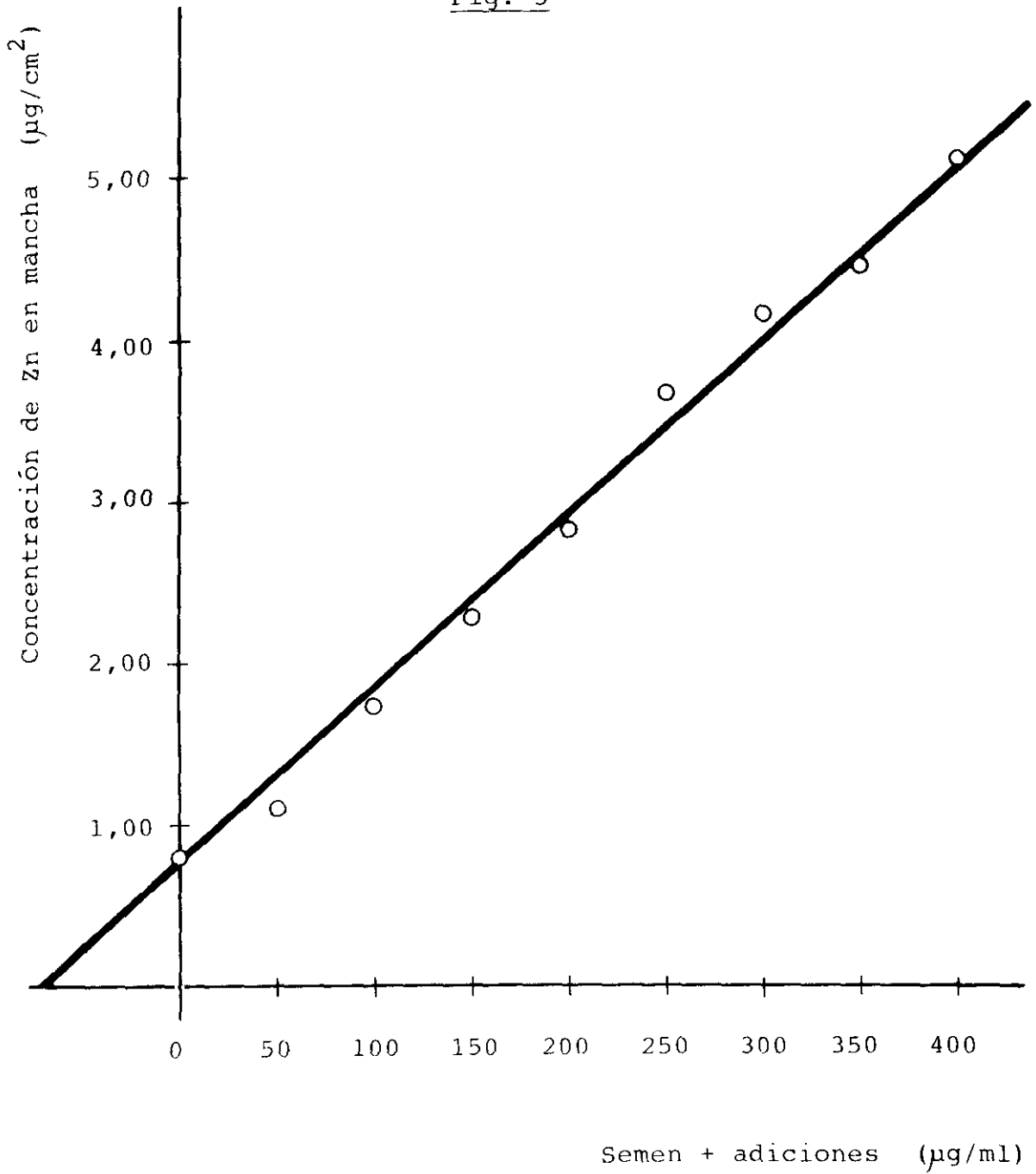
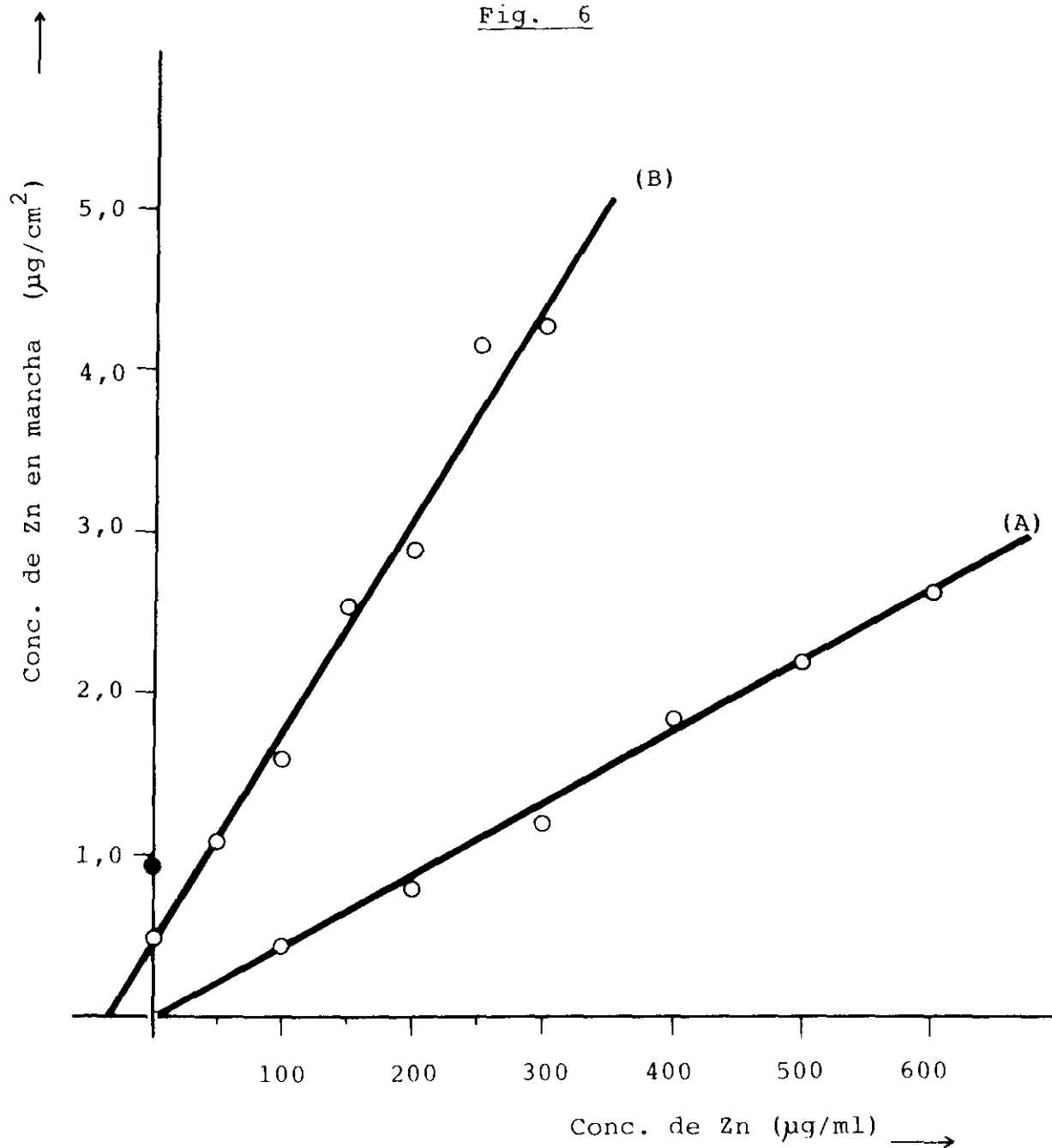


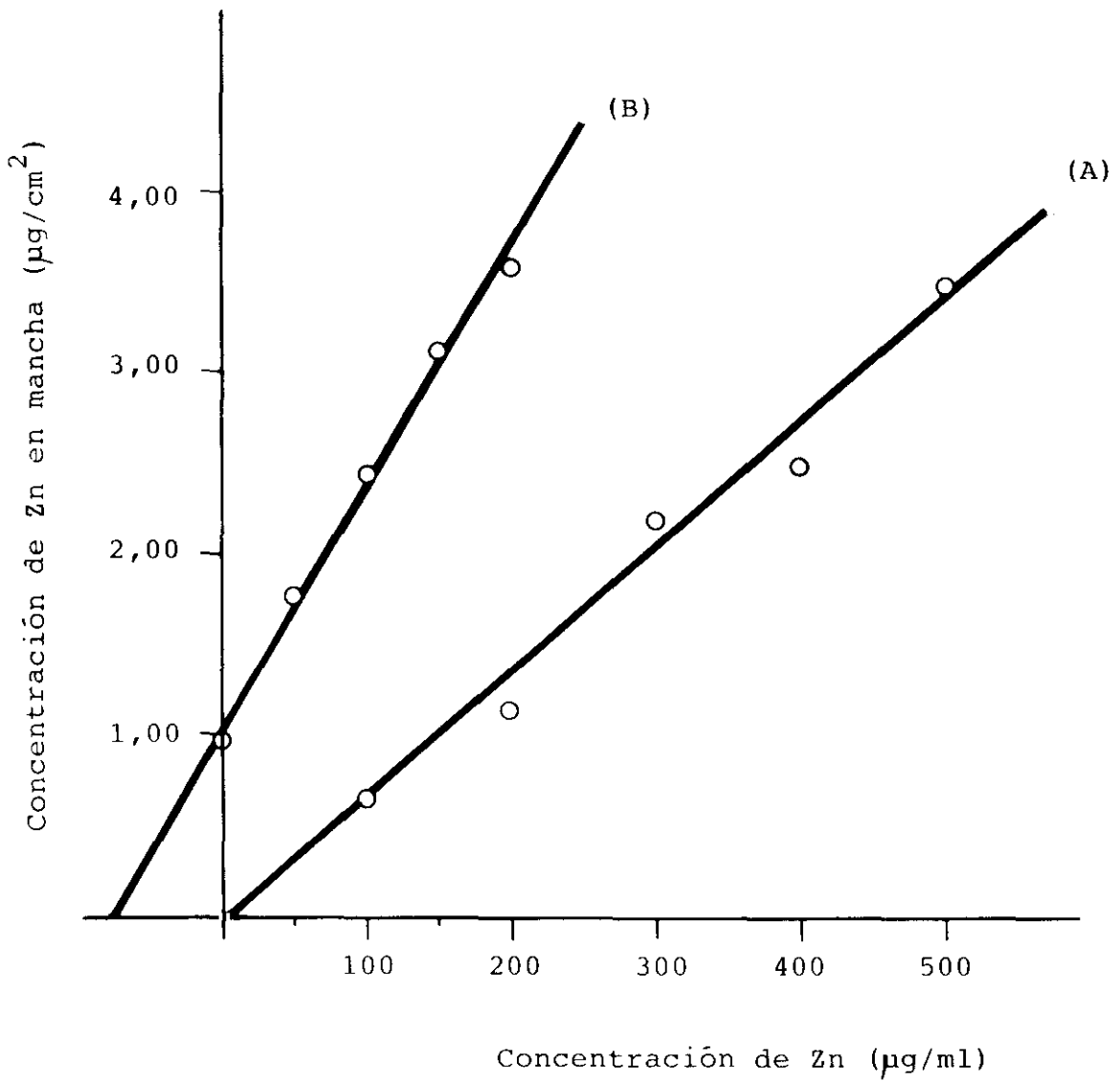
Fig. 6



(A). Soluciones acuosas
(B). Semen + adiciones (1/2)

● Conc. de Zn en mancha con semen sin diluir.

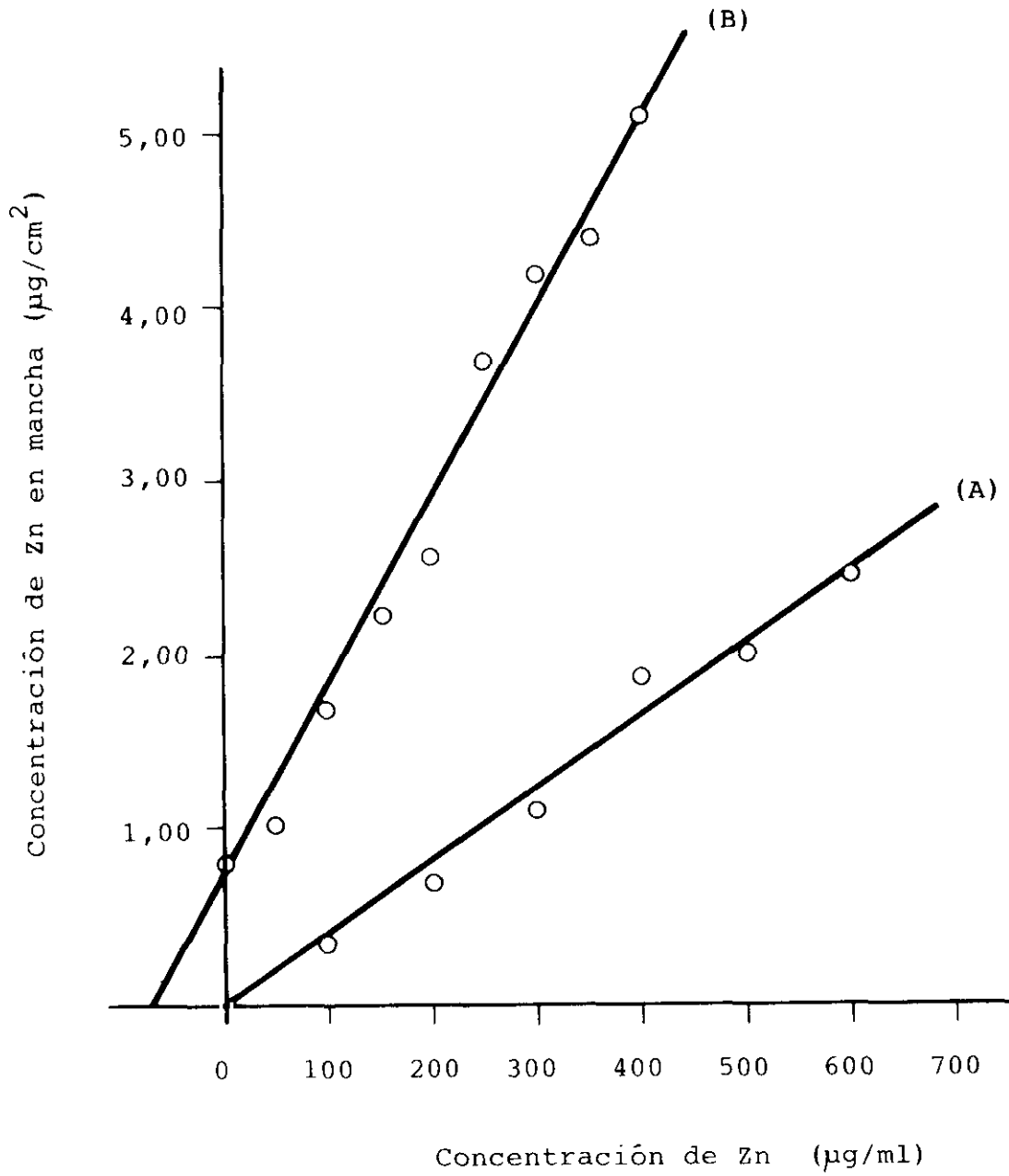
Fig. 7



(A).- Soluciones acuosas

(B).- Semen + adiciones (1/2)

Fig. 8



(A).- Soluciones acuosas

(B).- Semen + adiciones (1/2)

De acuerdo con lo indicado anteriormente, en la figura 6, se representa una experiencia análoga a la de la figura 5, pero acompañada de una serie de determinaciones complementarias con círculos obtenidos a partir de manchas realizadas en la misma tela que las de un semen adicionado, pero con soluciones acuosas de Zn de concentraciones conocidas. Esta experiencia, corrobora los datos antes encontrados, pero pone en evidencia la imposibilidad de poder deducir el valor de la concentración del elemento en la especie originaria de la mancha ya que, como puede apreciarse por las pendientes de las rectas obtenidas, la propia composición del semen (ya que se trata de la misma tela) ejerce un efecto concomitante y ello no nos permite aplicar ninguna fórmula que nos pueda dar, a través del valor conocido de las soluciones acuosas utilizadas por nosotros en provocar manchas y luego determinar analíticamente sus valores correspondientes para, en función de éstos y el del correspondiente al hallado en la posible mancha de semen, poder descubrir la concentración Zn en la especie buscada. No obstante, la gráfica de recuperación demuestra, al igual que la anterior figura, que existe una total recuperación de las cantidades del metal adicionadas al semen, lo que vuelve a poner en evidencia la exactitud del método. Por lo tanto según las experiencias recogidas en las figuras: 5, 6, 7 y 8, estas tres últimas obtenidas a partir de un mismo criterio de reafirmación experimental, no se puede deducir el valor de la concentración inicial del Zn en el semen, o de la sustancia que originó la mancha analizada, a través de manchar nuevamente la tela con las soluciones de Zn de concentración conocida y realizar los análisis en paralelo, ya que no es sólo por el efecto de la especie, demostrado por el hecho que las pendientes de las curvas son diferentes, sino también por el efecto que ha de generar la tela

debido a su envejecimiento, ya que la consistencia de la misma tela en el momento de producirse la mancha puede evolucionar, y al manchar posteriormente en el laboratorio cabe la posibilidad de que la impregnación difiera de la conseguida en el momento anterior, motivada por un posible cambio de textura en la tela.

Con el fin de estudiar la concentración de Zn en manchas que pudieran proporcionar otras sustancias biológicas con posibilidad de generar manchas análogas, las cuales pudieran crear confusión en el momento de adjudicárselas a la presencia de semen, en el caso de suministrar valores de concentración similares.

Se ha experimentado mediante obtención de manchas con semen, sangre y orina sobre diferentes telas, para comprobar los resultados que puedan aparecer y establecer la comparación entre ellos. En las tablas 5 y 6 quedan consignados los resultados obtenidos y a tenor de ellos aparece demostrado, en función de las diferencias encontradas, que la única sustancia capaz de producir manchas identificables a través de las determinaciones analíticas de Zn en las mismas, es el semen y por ello está fundamentado el desarrollo e introducción del método propuesto. Valores de concentración similares, se ha experimentado mediante obtención de manchas con semen, sangre y orina sobre diferentes telas, para comprobar los resultados que puedan aparecer y establecer la comparación entre ellos. En las tablas 5 y 6 quedan consignados los resultados obtenidos y a tenor de ellos aparece demostrado, en función de las diferencias encontradas, que la única sustancia capaz de producir manchas identificables a través de las determinaciones analíticas de Zn en las mismas, es el semen y por

ello creemos firmemente que está fundamentado el desarrollo e introducción del método propuesto y formulado por nosotros.

En la figura 9, aparecen expuestos gráficamente los resultados obtenidos al manchar 3 telas diferentes con un mismo semen adicionado y con soluciones acuosas de Zn de diferentes concentraciones, para estudiar el efecto concomitante de la tela en las determinaciones.

Como puede comprobarse, las pendientes de las curvas obtenidas varían de una tela a otra; así mismo las pendientes de las soluciones acuosas también difieren entre sí, según la tela que se haya manchado, y son distintas a su vez de las pendientes obtenidas a partir del semen, lo que reafirma que no sólo influye en el resultado la composición del semen, como ya habíamos dejado evidenciado, sino que también la tela, en función de sus características, ejerce su acción concomitante en el proceso analítico.

En la tabla 7, aparecen tabulados los resultados que se hallan al analizar diferentes manchas de distintas especies de semen sobre una misma tela. Las concentraciones de Zn encontradas difieren entre sí, lo que obliga a pensar que ello es la consecuencia de los diferentes valores del metal en cada una de las especies, hecho confirmado en las experiencias anteriores.

TABLA 5

Determinación de Zn en telas manchadas.

Especie	Tela	Conc. Zn en sol.de ataque ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. de Zn en tela (BCO) ($\mu\text{g/ml}$)	Diferencia	Conc. de Zn en mancha ($\mu\text{g/cm}^2$)	Valor medio comparativo (*)
Semen 1	B	0.048	0.005	0.043	0.90	---
Semen 2	B	0.080	0.005	0.075	1.56	1.23
Agua	B	0.000	0.005	- 0.005	---	---
Orina 1	B	0.004	0.005	- 0.001	---	---
Sangre 1	B	0.013	0.005	0.008	0.17	0.17
Orina 1	V	0.061	0.061	0.000	0.00	---
Sangre 1	V	0.069	0.061	0.008	0.17	---

(*) Valor medio comparativo

Semen
Sangre
Orina

TABLA 6

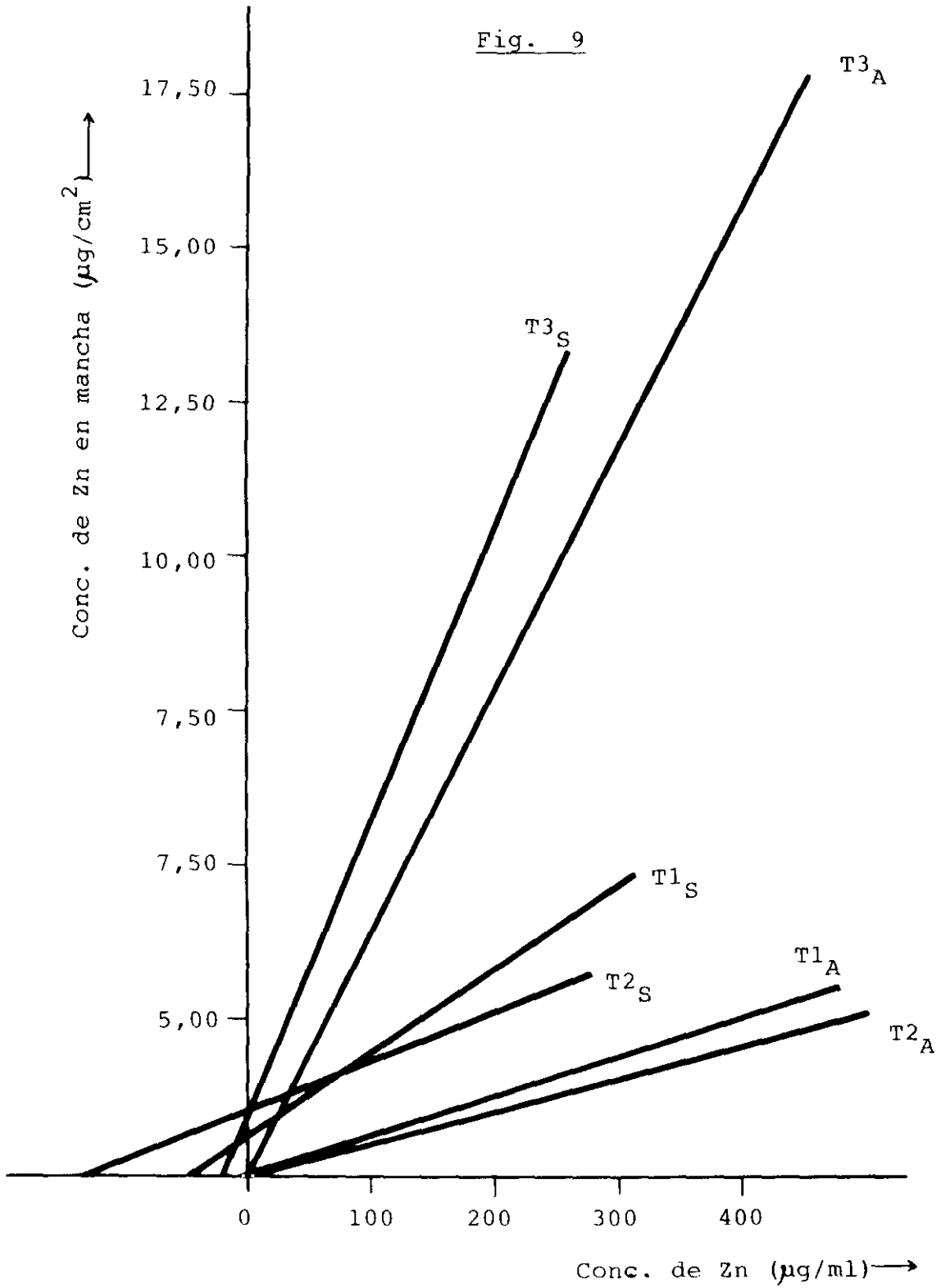
Determinación de Zn en telas manchadas de diferentes especies biológicas.

Diferentes telas.

Especie	Tela	Conc. de Zn en sol. de ataque (Cs) ($\mu\text{g/ml}$)	Conc. de Zn en tela (BCO) ($\mu\text{g/ml}$)	Diferencia (Cs) ($\mu\text{g/ml}$)	Valor comparativo (misma tela) ($\mu\text{g/cm}^2$)	Conc. de Zn en mancha. (*) (Cm) ($\mu\text{g/cm}^2$)	Valor comparativo (misma tela) ($\mu\text{g/cm}^2$)
Orina	1	0.015	0.015	0.000	0.000	0.00	0.00
Orina	2	0.019	0.018	0.001		0.02	
Orina	3	0.129	0.026	0.003		0.06	
Orina	4	0.046	0.044	0.002		0.04	
Sangre	1	0.028		0.013	0.013	0.27	0.27
Sangre	2	0.038		0.020		0.42	
Sangre	3	0.047		0.021		0.44	
Sangre	4	0.076		0.032		0.67	
Semen A	1	0.139		0.124	0.0163 ± 0.074	2.58	3.40 ± 1.54
Semen B	1	0.168		0.153		3.19	
Semen C	1	0.228		0.213	$(x \pm 2 \text{ d.s.})$	4.44	$(x \pm 2 \text{ d.s.})$

(*) Cm = 20.83 Cs

Fig. 9



T1, T2 y T3 : Telas manchadas
S : Semen adicionado con Zn
A : Soluciones acuosas de Zn

TABLA 7**Determinación de Zn en manchas de semen.**

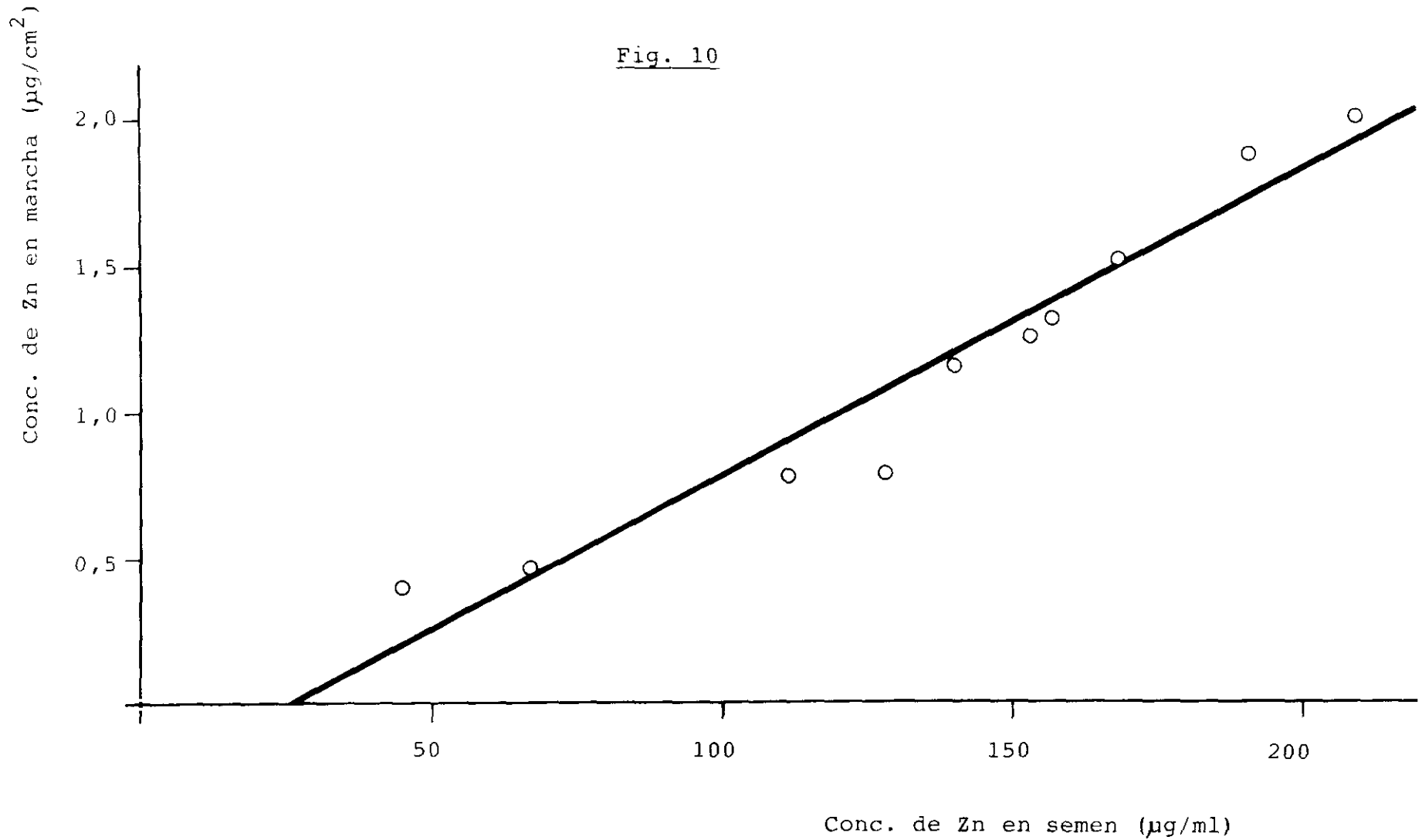
Diferentes especies seminales en una misma tela.

Semen	Conc.de Zn en sol.de ataque (Cs) ($\mu\text{g/ml}$)	Conc.de Zn en tela (BCO). ($\mu\text{g/ml}$)	Diferencia ($\mu\text{g/ml}$)	Conc.de Zn en mancha. (Cm) ($\mu\text{g/cm}^2$) (*)
1	0.103	valor medio a partir de 7 determinaciones $\bar{Zn} \pm 2 \text{ d.s.} = 0.015 \pm 0.003$	0.088	1.83
2	0.091		0.076	1.58
3	0.151		0.136	2.83
4	0.093		0.078	1.62
5	0.197		0.182	3.79
6	0.062		0.047	0.98
7	0.113		0.098	2.04
8	0.072		0.057	1.19
9	0.056		0.041	0.85
10	0.106		0.091	1.90
11	0.064		0.049	0.83
12	0.147		0.132	2.75
13	0.102		0.087	1.81
14	0.125		0.110	2.29
15	0.100		0.085	1.77

 (*) Cm = 20.83 Cs

Para profundizar en dicha situación acabada de mencionar hemos realizado la siguiente experiencia que aparece expuesta en la figura 10 y en la tabla 8. Como se puede comprobar en ellas, existe una correlación lineal entre los niveles de concentración de Zn en cada especie de semen (determinados por el método de Arroyo y col.) y los valores del metal encontrados en las manchas correspondientes. Al aplicar el método estadístico a los resultados obtenidos se ha encontrado para dichos valores un coeficiente de correlación de 0.96581.

49



Correlación entre valores de concentración de Zn en diferentes especies seminales y los correspondientes a las manchas con ellas obtenidas.

TABLA 8

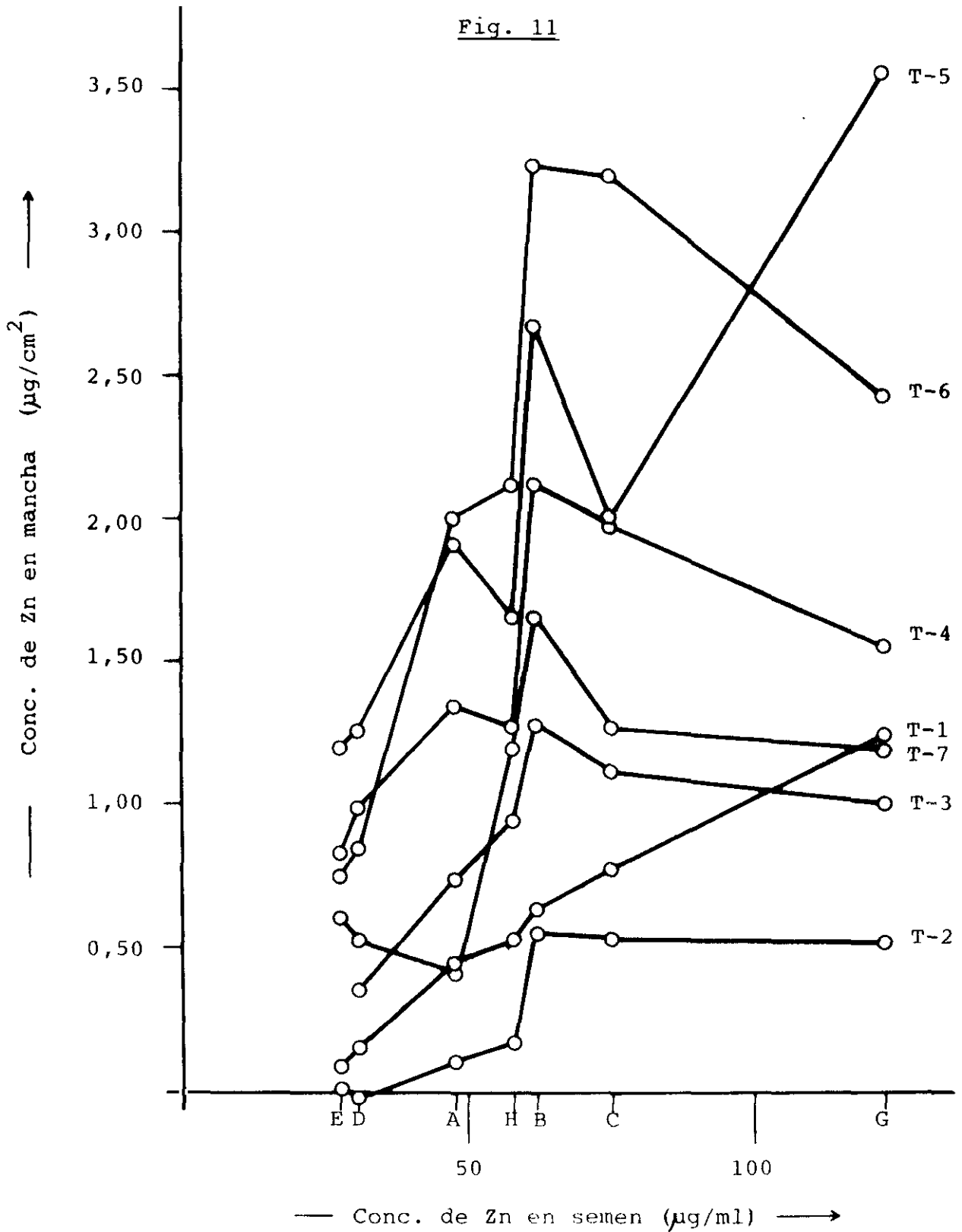
Determinación de Zn en semen (distintas especies) y manchas de tela correspondientes.

SEMEN		MANCHA (misma tela)				
Muestra	Conc.de Zn en la especie (µg/ml)	Muestra Correspondiente	Bco (µg/ml)	Conc.de Zn en sol.de ataque (µg/ml)	Diferencia (µg/ml)	Conc.de Zn en mancha. (µg/cm ²)
As	168	Am	0.022	0.100	0.078	1.62
Bs	45	Bm		0.041	0.019	0.40
Cs	111	Cm		0.059	0.037	0.77
Ds	128	Dm		0.060	0.038	0.79
Es	157	Em		0.085	0.063	1.31
Fs	209	Fm		0.118	0.096	2.00
Gs	67	Gm		0.044	0.022	0.46
Hs	140	Hm		0.077	0.055	1.15
Ls	153	Lm		0.082	0.060	1.25
Ms	191	Mm		0.112	0.090	1.87

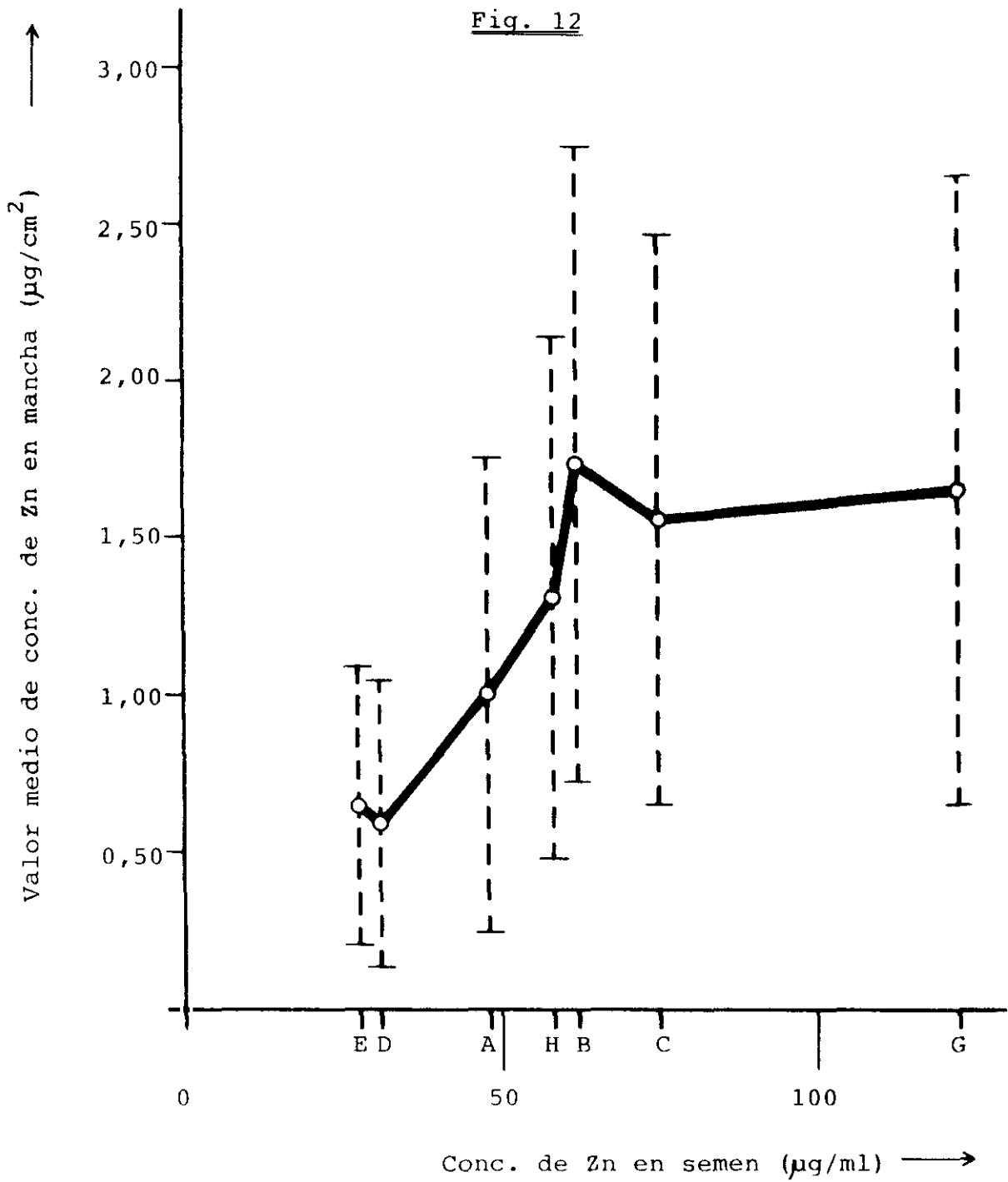
Finalmente, en las figuras 11 y 12 y en las tablas 9, 10, 11 y 12, quedan recogidas las experiencias últimas que confirman todo cuanto hemos venido detallando hasta ahora. El estudio ha consistido en manchar una serie de telas de diferente composición una a una con otra serie de distintas especies de semen, cuyas concentraciones han sido determinadas previamente.

En la figura 11, quedan en evidencia dos hechos ya demostrados: en primer lugar que las manchas de cada tela proporcionan valores de concentración de Zn diferentes según sea el contenido del metal en las especies y en segundo término que, pese a no seguir una variación lineal, y para cada una de las telas, los valores de Zn hallados en las manchas correspondientes son mayores al incrementar el nivel del metal en el semen que ha producido la mancha. Esto se manifiesta de una forma más generalizada en la figura 12, en la que se comprueba también todo lo expuesto en la figura 11, con la observación acabada de aludir referente al incremento irregular de los valores de Zn hallados en las manchas y de la variación de éstos en función de la concentración del metal en relación con el semen que las ha originado; los valores medios de Zn encontrados en las diferentes manchas obtenidas para cada especie, presentan en su práctica totalidad un aumento, que aunque irregular, guarda relación con los valores ascendentes del elemento en la correspondiente especie seminal. Todo lo expresado gráficamente en ambas figuras se recoge con datos numéricos en las tablas 9 y 10. A su vez las tablas 11 y 12 muestran el estudio estadístico referente a todos los datos correspondientes a las experiencias consignadas en las figuras 11 y 12 y las tablas 9 y 10.

Fig. 11



Manchas obtenidas en diferentes especies seminales (A,B,C,D,E,G y H) en distintas telas (T).



Valores medios de concentración de Zn ($\bar{x} \pm ds$) en el total de las manchas obtenidas con diferentes especies seminales (A,B,C,D,E,G y H) en distintas telas.

TABLA 9

Valor medio de las concentraciones de Zn en la totalidad de las superficies de las manchas en siete diferentes telas, para distintas especies de semen ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

SEMEN		Concentración de Zn en el total de las manchas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).		
nº	Conc. de Zn ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Valor Medio	Desviación standard	Intervalo de confianza para la media (P < 0.05)
1 (A)	48	1.00	0.76	0.43 - 1.56
2 (B)	62	1.74	1.01	0.99 - 2.48
3 (C)	75	1.56	0.91	0.88 - 2.23
4 (D)	31	0.59	0.46	0.25 - 0.94
5 (E)	28	0.65	0.45	0.32 - 0.98
6 (G)	123	1.65	1.02	0.89 - 2.41
7 (H)	58	1.32	0.84	0.69 - 1.93

TABLA 10

Valor medio de las concentraciones de Zn en la totalidad de las superficies de las manchas obtenidas con siete diferentes especies de semen, para distintas telas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

TELA	Concentración de Zn en el total de las manchas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).		
	Valor Medio	Desviación standard.	Intervalo de confianza para la media ($P < 0.05$)
T - 1	0.55	0.40	0.26 - 0.85
T - 2	0.28	0.25	0.09 - 0.46
T - 3	0.93	0.31	0.71 - 1.16
T - 4	1.45	0.47	1.10 - 1.80
T - 5	2.03	0.84	1.41 - 2.65
T - 6	2.08	1.00	1.34 - 2.82
T - 7	1.17	0.75	0.62 - 1.72

TABLA 11

Estudio estadístico de la relación comparativa entre los valores medios de concentración de Zn en manchas de semen en distintas clases de telas, correspondientes a siete especies de semen diferentes con las que se han manchado aquéllas.

Pares de especies de semen	Valor estadístico	Pares de especies de semen	Valor estadístico
A - B	No signif.	C - D	P < 0.05
A - C	" "	C - E	P < 0.05
A - D	" "	C - G	No signif.
A - E	" "	C - H	" "
A - G	" "	D - E	" "
A - H	" "	D - G	P < 0.05
B - C	" "	D - H	P < 0.10
B - D	P < 0.05	E - G	P < 0.05
B - E	P < 0.05	E - H	P < 0.10
B - G	No signif.	G - H	No signif.
B - H	" "		

TABLA 12

Estudio estadístico de la relación comparativa entre los valores medios de concentración de Zn en manchas correspondientes a siete telas diferentes, manchadas cada una de ellas con distintas especies de semen.

Pares de telas.	Valor estadístico.	Pares de telas.	Valor estadístico.	Pares de telas.	Valor estadístico.
T1 - T2	No signif.	T2 - T5	P < 0.01	T4 - T7	No signif.
T1 - T3	P < 0.10	T2 - T6	P < 0.01	T5 - T6	No signif.
T1 - T4	P < 0.01	T2 - T7	P < 0.05	T5 - T7	P < 0.10
T1 - T5	P < 0.01	T3 - T4	P < 0.05	T6 - T7	P < 0.10
T1 - T6	P < 0.01	T3 - T5	P < 0.05		
T1 - T7	P < 0.10	T3 - T6	P < 0.05		
T2 - T3	P < 0.001	T3 - T7	No signif.		
T2 - T4	P < 0.001	T4 - T5	No signif.		
		T4 - T6	No signif.		

Como dato final que corrobora todo cuanto hemos detallado, hemos incluido la tabla 13, en la que se presentan los resultados de las determinaciones de Zn efectuadas por nosotros con la ayuda del método propuesto, en manchas de telas correspondientes a prendas de vestir de mujeres que habían sido violadas y confirmadas pericial y judicialmente las violaciones correspondientes.

Como puede comprobarse en dicha tabla existe positividad en todas las pruebas analíticas, que confirman la presencia de Zn en dichas manchas, lo que demuestra la efectividad del método.

En virtud de ello esperamos que el método pueda ser utilizado en el presente y en el futuro para la obtención de pruebas valiosas que confirmen la existencia de violación en todos aquellos casos dudosos en los que existan ropas con manchas originadas por la presencia de especies seminales.

TABLA 13

Determinación de Zn en manchas de tela (prendas de vestir) en casos de violación comprobada.

CASO	Concentración de Zn en solución de ataque Cs ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración de Zn en la tela (blanco) ($\mu\text{g/ml}$)	Diferencia ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración de Zn en mancha Cm ($\mu\text{g/cm}^2$)
1	0.016	0.009	0.007	0.15
2	0.150	0.095	0.055	1.15
3	0.153	0.003	0.150	3.12
4	0.072	0.030	0.042	0.87

* DISCUSIÓN GENERAL *

La determinación analítica de un elemento o compuesto que forma parte como componente de una sustancia (en nuestro caso el Zn presente en el semen), que pueda realizarse a partir de una mancha de la misma presente en una prenda de vestir de tela, que nos permita identificar tal sustancia a través de una dosificación del componente, tanto por su presencia como por la magnitud de su concentración, ha sido un tema, que en el caso del semen se ha dado cumplida cuenta de él en la introducción del presente trabajo.

En nuestro caso particular, la evaluación cuantitativa de un metal, el Zn, presente en el semen en una concentración muy significativa, a través de un análisis en manchas de tela, ha de servir para identificar la presencia de una especie seminal en la prenda de ropa manchada.

Estos elementos o compuestos, cuya presencia en diferentes medios o sustancias nos han de servir para la identificación de la especie a la que pertenecen, podríamos denominarlos "indicadores" ya que hemos de considerarlos como tales de la presencia de la especie buscada (en nuestro caso el semen) en cualquier variedad de materiales de forma general, y en telas en lo que a nosotros nos atañe en particular.

La condición necesaria para culminar con éxito una prueba de este tipo, esto es, la determinación de una sustancia exógena en un material a estudiar debe llevar

implícitos los siguientes puntos:

- La existencia de uno o varios "indicadores".

- La existencia de un método analítico lo suficientemente exacto, sensible y específico para efectuar la correspondiente dosificación del "indicador".

- La posibilidad de aplicación de dicho método a muestras convenientes.

En nuestro caso concreto el "indicador" es el Zn, presente en la sustancia que mancha la ropa (semen) y la muestra a analizar la tela correspondiente.

Si procedemos a una ampliación detallada de cuanto acabamos de exponer y en función de la importancia que puede llegar a alcanzar dentro del campo de la medicina forense el método propuesto en el presente trabajo y su posible futura aceptación, hemos de dar paso a una nueva serie de consideraciones fundamentales que consignamos a continuación.

El método ha de cumplir un número de objetivos o requerimientos exigibles todos ellos para la utilización de los análisis de Zn en manchas de tela como "indicadores" de la presencia de semen en dichas manchas, procedentes de casos de violación, que podemos identificar y enumerar como los siguientes:

- Que se pueda determinar efectivamente su presencia en ropas de mujeres sometidas a violación.

- Que permita el establecimiento de valores de referencia, en función de los valores de concentración hallados.

- Que exista relación entre dichos valores y los que se vayan a encontrar, la cual permita extraer las conclusiones oportunas.

- Que pueda integrarse en programas de investigación futuros, con el carácter de prueba necesaria.

- Que además sirva de ayuda a otras pruebas que se hallen vigentes, como complemento específico de ellas; en este caso existe la posibilidad de que sea una prueba más efectiva que ellas, en los diversos aspectos que pueda entrañar (costo, rapidez, sencillez, sensibilidad, especificidad, etc.), lo que da paso a una situación mejor aún.

- Que el tiempo en que se tarde en realizar la prueba, desde el momento en que se manchó la tela hasta el de su correspondiente análisis, no sea un impedimento para poder efectuarla con absoluta garantía en su ejecución y en sus resultados.

- Que la posible contaminación de la muestra no alcance una concentración cuya magnitud sea capaz de enmascarar un resultado correcto.

El repaso detallado de estos requerimientos, junto con el estudio concienzudo del método propuesto, deja en evidencia que éste encaja perfectamente en los condicionamientos necesarios para su viabilidad y su consiguiente y futura

aplicación generalizada.

Una de las características más relevantes del método que proponemos la constituye su especificidad, reforzada a su vez por la ventaja de que sirve también para muestras azoospérmicas, puesto que en éstas no falta la presencia de Zn. Nos limitaremos aquí, puesto que una mayor extensión no es necesaria, a presentar una serie de datos que sintetizan cuantos han aparecido en la *literatura internacional* y que *confirman nuestras experiencias ya consignadas* en el estudio del metal, esto es, que las concentraciones de Zn en los líquidos biológicos capaces de manchar las telas en caso de agresión o por cualquier otra causa, son tan inferiores a las del metal en el semen, que a la hora de verificar su determinación a partir de una mancha de tela no se alcanza su límite de detección, o la cantidad hallada ha de ser tan inferior a la encontrada para cualquier tipo de semen, aun procedente de una especie seminal de contenido bajo en el elemento, que ha de resultar discriminatoria. En la tabla 14 presentamos unos datos comparativos oportunos, seleccionados entre los más recientes y representativos entre los múltiples existentes, con los que guarda una total similitud. En ella podemos comprobar la apreciable diferencia existente entre las concentraciones de Zn de las otras especies y la del semen, que son de un orden de superioridad lo suficiente como para conferir a éste último el carácter de especificidad, incluso en especies azoospérmicas.

Respecto a los posibles antecedentes relacionados íntimamente con nuestro estudio, existe un trabajo de Suzuki y colaboradores (1983) en el que se da cuenta de un método cualitativo para la identificación de manchas de Zn, mediante una reacción con 1- (2-piridilazo)-2 naftol que desarrolla un color rojo

TABLA 14

Concentraciones de Zn en las principales especies biológicas capaces de generar manchas en prendas de ropa de vestir (valores medios).

Especie	Concentración media de Zn en mg/l	Referencia
<u>Sangre</u>	6.35	E. Sabbioni y cols. (1990) ^(*)
(total)	6.40	G. V. Iyengar y cols. (1988) ^(**)
<u>Suero</u>	0.92	(*)
	0.93	(**)
<u>Orina</u>	0.45	(*)
	0.46	(**)
<u>Semen</u> (nº espermios)		M. Arroyo y cols. (1978)
0 (azoospermicos)	173	
0 - 10 x 10 ⁶	155	
(10.1 - 20) x 10 ⁶	145	
(20.1 - 30) x 10 ⁶	124	
(30.1 - 40) x 10 ⁶	129	
> 40.1 x 10 ⁶	152	

y que ha sido aplicado por Scheithauer y Luta (1988). Es evidente que la diferencia entre una prueba cuantitativa y específica como la que nosotros proponemos y no otra cualitativa mediante la obtención de una mancha coloreada evita cualquier comprobación.

El hecho de que el método propuesto no ha de suponer problema alguno para cualquier facultativo con cierta experiencia profesional, no significa que por ello deje de entrañar ciertas dificultades, inherente al tipo de muestra que se ha de manipular y a la concentración del elemento a analizar, ya que el problema de la contaminación no debe soslayarse, y dada la notoria importancia y responsabilidad de los resultados que se hayan de suministrar, cualquier fallo en ellos puede desacreditar al laboratorio correspondiente.

Los errores fundamentales que se puedan cometer hemos de adjudicarlos preferentemente a la contaminación, que puede ocurrir no solamente durante la fase de ejecución del análisis, sino también en la etapa anterior al mismo. Para ello, es de relevante importancia un exámen y conocimiento previo de las características de la muestra que se ha de analizar (naturaleza de la tela, estado de conservación, la forma en que ha sido recogida, etc).

Cualquier muestra que no reúna las necesarias condiciones que avalen un análisis correcto, debe ser rechazada, ya que así lo exige la seguridad obligada para garantizar la certeza de los datos que se han de suministrar, basados en una excelente práctica profesional de laboratorio firmemente establecida.

* CONCLUSIONES *

PRIMERA.- Se propone un nuevo método analítico, para la determinación de Zn en manchas de telas de ropa de vestir procedentes de casos de violación, mediante el empleo de la espectrofotometría de absorción atómica.

SEGUNDA.- La existencia de Zn en dichas manchas debe considerarse como "indicador" de la presencia de semen en la misma, ya que se trata de una sustancia biológica poseedora de un alto contenido en el metal y capaz de poder discriminarla de otro tipo de material biológico y ser determinada cuantitativamente.

TERCERA.- La prueba demostrativa de la presencia de semen en las manchas de tela a través de su "indicador" el Zn, abre un nuevo horizonte en las investigaciones que puede utilizar la medicina legal ya que además de proporcionar un nuevo test de identificación para añadir a los ya existentes, es muy estable.

CUARTA.- Esta nueva prueba puede utilizarse no solamente como tal para la exclusión del semen, sino también como complemento confirmatorio de las que ya constituyen rutina en este tipo de análisis, para reforzar los datos obtenidos.

QUINTA.- El método propuesto posee la ventaja de su gran simplicidad operatoria, lo que supone que ha de poseer cierto atractivo, pese a su novedad, para ser incorporado en los laboratorios dedicados a la especialidad y con dotación adecuada.

SEXTA.- El método posee además otra ventaja que podríamos denominar "elasticidad", esto es, que puede modificarse oportunamente con gran facilidad (utilizar más círculos de la mancha, etc) con posibilidad de mejora en el límite de detección, caso de que ello fuese necesario.

SÉPTIMA.- El método posee todos los requerimientos necesarios para su futura aceptación generalizada, en medicina legal.

*

BIBLIOGRAFÍA

*

Arroyo, M. y Palenque, E. 1974. Determinación analítica de Zn en líquidos orgánicos por espectrofotometría de absorción atómica. I Inespecificidad en las mediciones y método espectrofotométrico para su corrección. *Revista Clínica Española*. Vol.133, pag 211.

Arroyo, M. y Palenque, E. 1974. Determinación analítica de Zn en líquidos orgánicos, por espectrofotometría de absorción atómica II Métodos analíticos. *Revista Clínica Española*. Vol.134, pag 227.

Arroyo, M. Caballero Peregrin, C. Páramo, P. Gorostiza, C. Martín Serrano, J. Oliveros, A. Gonzalez, G. Fariñas, M. 1978. Correlación entre algunos metales componentes del semen humano. *Acta Ginecológica*. Vol.33, pag 373.

Arroyo, M. Caballero Peregrin, C. Páramo, P. Martín Serrano, J. 1978. Valor diagnóstico de la concentración de algunos metales en el esperma humano. *Acta Ginecológica*. Vol.33, pag 379.

Arroyo, M. Caballero Peregrin, C. Páramo, P. Gorostiza, C. Martín Serrano, J. Fariñas, M. 1978. Variaciones en la concentración de algunos metales del semen humano en relación con poblaciones diferentes seleccionados según el número de espermatozoides. *Acta ginecológica*. Vol.33, pag 385.

Baecchi, B. 1913. Sulla genesi della reazione del Barberio. *Arch. Farmacol. Sper. Sci. Affini* 14: 527-541.

Bagchi, R.B. 1939. Importance of chemical tests for detection of seminal stains in medico-legal investigations. *Indian Med. Gaz.* 74: 683-686.

Barberio, M. 1905b. A new microchemical reaction of the sperma and its application in medicolegal investigations. *Medico-legal J. (NY)* 23(3): 383-393.

Bayard, H. 1839. Examen microscopique du sperme désseché sur le linge, sur les tissue de nature et de coloration diverses. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 22: 134-170.

Beckman, L. and B. Kjeslar. 1968. Isozymes of human sperm esterase: Variations in a sample of men attending an infertility clinic. *Acta Genet. Stat. Med.* 18: 55-60.

Benotti, J., L. Rosenberg and B. Dewey. 1946. Modification of the Gutman and Gutman method of estimating "acid" phosphatase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 31: 357-360.

Berg, S.P. 1949. Der Spermanachweis nach Puranen und seine forensische Bedeutung. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* 39: 283-295.

Berg, S.P. 1954. Methoden sum Nachweis von Genitalsekretspuren. *Dtsch. Z. Gesamte. Gerichtl. Med.* 42: 605-613. N^o 83.- Blanco, A. and W.H. Zinkhan. 1963. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science.* 139: 601-602.

Berg, S.P. 1948. Diaminooxydasebestimmung bei Spurenuntersuchungen. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* 39: 89-109.

Bocarius, N. 1907. Ueber einige mikrochemische Reaktionen des Spermas. *Vierteljahrschr. Gerichtl. Med. Oeff. Sanitaetswes.* 33 (3F): 217-225.

Boutmy and Brouardel (P), 1880. Rapport sur le procédé Petel et Labiche destiné a faire découvrir les taches de sperme. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 4 (3 ser): 224-227.

Brouardel, (P). 1879. Des taches spermatiques. *Le Practicien* 2(28): 332-336.

Bures, L. 1968. Appearance of spermine in seminal stains determined by paper electrophoresis. *Sud. Med. Ekspert.* 11(3): 46-47 and see *Chem. Abstr.* 70: 27238 (1969).

Cevidalli, A. 1906. Ueber eine neue mikro-chemische Reaktion des Spermas. *Vierteljahrschr. Gerichtl. Med. Oeff. Sanitaetswes.* 31 (3F): 27-37.

- Cernov, V.P. 1971. Detecting and species diagnosing of seminal stains: an immunological method. *Sud. Med. Ekspert.* 14(4): 28-30.
- Chevallier, A. 1834. Rapports judiciaires faits dans le but de reconnaitre la nature de taches sur le linge. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 11: 210-233
- Chittenden, R.H. 1881. Salivary digestion and the products formed. *Am.*
- Chevalier, C. 1839. *Des Microscopes et de Leur Usage.* Author and Crochard Libraire, Paris.
- Coombs, R.R.A., C.B. Richards and B. Dodd. 1963. Serological identification of seminal stains. *Med. Sci. Law* 3: 65-70.
- Culliford, B.J. 1964. A new method for precipitin reactions on forensic blood, semen and saliva stains. *Nature* 201: 1092-1094.
- Darwiche, Z., Ph. Tran Van Ky and P.H. Muller. 1970. Nouvelle technique de l'électrophorèse appliquée a l'identification de l'enzyme spécifique du sperme humain. *Med. Leg. Dommage Corpor.* 3: 407-412.
- Davis, J.H. and R.R. Gomez. 1975. Improved methods of acid phosphatase determination in the investigation of rape. *Forensic Sci.* 5: 119.
- De Domincis, A. 1912. Una modificazione per effecto del tempo nella reazione del tribromuro d'oro. *Arch. Int. Med. Leg.* 3: 10-12.
- Dervieux, F. 1909. Contribution a l'étude medico-legale du sperme. Recherche directe des spermatozoides sur le linge, les étoffes blanches et le bois. *Ann Hyg. Publique Med. Leg.* 12(4 ser): 210-230.
- Dervieux, F. 1910. De la valeur comparative de certains réactions michrochimiques dans la recherche du sang et du sperme. *Arch. Int. Med. Leg.* 1 (Suppl.): 92-94.
- Devergie, A. 1839a. Signes nouveaux de la mort par suspension. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 21: 168-177.

Devergie, A. 1839b. Réponse a la réfutation de M. Orfila sur le nouveaux signes de suspension. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 21: 466-473.

Djalalov, D.D. 1974. Simultaneous detecting of choline, spermine, acid phosphatase and spermatic amino acids in seminal stains by paper chromatography. *Sud. Med. Ekspert.* 17(2): 38-41.

Farriaux, J.P., P.H. Muller and G. Fontaine. 1967. Identification du sperme humain par mise en évidence de la fraction de la lactico-déshydrogenase. *Lille Med.* 12: 687-693.

Faulds, J.S. 1951. Phosphatase in dried seminal stains. *Edinburgh Med. J.* 58: 94-98.

Fiori, A. 1957. Metodi cromatografici su carta nella diagnosi medico-legale di macchia di sperma. *Minerva Medicoleg.* 77: 131-143.

Florence (A.) (1896) Du sperme et des taches de esperme en médecine legale. *Arch. Anthropol. Crim. Criminol.* 11: 37-46 and 146-165 and 249-265.

Forbes, G. 1940. The scope and fallacies of the Florence reaction for seminal stains. *Police J.* 13: 162-171.

Gomez, R.R., C.D. Wunsch, J.H. David and D.J. Hicks. 1975. Qualitative and quantitative determinations of acid phosphatase activity in vaginal washings. *Am. J. Clin. Pathol.* 64: 423-432.

Gomori, G. 1941. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and pathological conditions. *Arch. Pathol.* 32: 189-199.

Griffiths, P.D. and H. Lehmann. 1964. Estimation of creatine phosphokinase as an additional method for identification of seminal stains. *Med. Sci. Law.* 4: 32-34.

Gültingen, A. 1961. Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Spermanachweis methoden an Flecken, besonders der papier chromatographischen Verfahren. Inaugural-Dissert., Rheinische.

- Gutman, A.B. and E.B. Gutman. 1938. An "acid" phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. *J. Clin. Invest.* 17: 473-478.
- Hallcock, R.R. 1974. Spermine and choline identification by thin-layer chromatography. *J. For. Sci.* 19: 172-174.
- Hansen, P.F. 1946. Determination of the "acid" prostatic phosphatase as a new method for medico-legal demonstration of sperm spots. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 23: 187-214.
- Hauck, G. and H. Leithoff. 1959. Die Phosphatasebestimmung als gerichtsmmedizinischer Spermanachweis. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* 49: 5-20
- Hazen, C.B. 1955. Measurement of acid phosphatase activity to identify seminal stains. *J. Crim. Law Criminol. Police Sci.* 46: 408-413.
- Hektoen, L. and W.D. McNally. 1923. Medico-legal examination of seminal stains. in: F. Peterson, W.S. Haines and R.W. Webster (eds.) *Legal Medicine and Toxicology*, 2nd ed., v. II, pp. 941-948. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Hermann, G. 1964. The seminal fluid. in: P. Grabar and P. Burtin (eds.) *Immuno-electrophoretic Analysis. Applications to Human Biological Fluids*, pp. 283-287, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, originally published as *Analyse Immuno-electrophoretique* by Masson et Cie, Paris, 1960.
- Herrmann, W.P. 1972b. Immuno-electrophoretic studies on glycoproteins of the human seminal plasma. *Arch. Derm. Forsch.* 243: 341-345.
- Hessel, D.W., F.R. Modglin and L.G. Webster. 1967. The identification of seminal fluid by thin-layer chromatography. *J. Forensic Sci.* 12: 554-557.
- Iyengar, G.V., Woittiez, J. "Trace elements in Human Clinical Specimens: Evaluation of the Literature Data to Identify Reference Values". *Clin. Chem.*, 34(3), 474-481 (1.988)

Johnston, W. 1896. A demonstration of Professor Florence's iodine reaction for seminal stains. *Montreal Med. J.* 25: 308-309.

Kahane, E. and J. Levy. 1937. Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. VI. Apparition de la choline dans les substances biologiques. La choline du sperme. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 19: 959-975.

Kaye, S. 1947. Identification of seminal stains. *J. Crim. Law Criminol.* 38: 79-83.

Kaye, S. 1949. Acid phosphatase test for identification of seminal stains. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 728-732.

Kaye, S. 1951. The acid phosphatase test for seminal stains. A study of the reliability of aged stains. *J. Crim. Law Criminol.* 41: 834-835.

Kerék, G. 1972. Praktische Erfahrungen bei nicht-morphologischen Prüfmethode und Blutgruppenbestimmung und "alten" Spermaflecken. *Arch. Kriminol.* 150: 11-20.

Kind, S.S. 1964. The acid phosphatase test. in: A. S. Curry (ed.) *Methods of Forensic Science*. v. III, pp. 267-288, Interscience, New York and London.

Kirk, P.L. 1953. *Crime Investigation*. Inter-science Publishers, Inc., New York.

Kosatík, A., S. Loyka and A. Rozmaric. 1966. Identifikation von Samenflecken durch den papierchromatographischen Nachweis der Zitronensäure. *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med.* 40: 315-322 and see *Chem. Abstr.* 68: 102428 (1968).

Kutscher, W. and H. Wohlbergs. 1935. Prostata-phosphatase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 236: 237-240.

Kutscher, W. and A. Wörner. 1936. Prosta-taphosphatase. 2 Mitteil. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.* 239: 109-126.

- Lassaigue, J.- L. 1858. Observations sur quelques reactions que presentent les taches spermatiques, les taches albumineuses et autres taches analogues. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 10 (2 ser): 405-408.
- Laves, W. 1948. Hyaluronidase und Zeugungs-fähigkeit. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* 39: 207-212.
- Lecha-Marzo, A. 1918. Estudio del esperma en medicina legal. *Los Prog. Clin.* 11: 249-280.
- Levonen, E. 1960. A method for identification of seminal stains by paper chromatography. *J. Forensic Sci.* 5: 102-109.
- Littlejohn, H. and J.H.H. Prairic. 1908. The microchemical tests for semen. *Edinburgh Med. J.* 23(N.S.): 410-417.
- Lundquist, F. 1950. Medicolegal identification of seminal stains using the acid phosphatase test. *Arch. Pathol.* 50: 395-399.
- MacLeod, J. and F. Wroblewski. 1958. Lactic dehydrogenase activity in human semen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99: 265-267.
- Menger, R. 1887. Microscopic investigation of supposed seminal spot on a child's clothing. *Texas Cour.-Rec. Med.* 4(6): 250-255
- Mischler, T.W. and E.P. Reineke. 1966. Immu-nological identification of human seminal stains. *J. Crim. Law Criminol. Police Sci.* 57: 107-111.
- Nakamura, G.R., S. Kusafuka, R.M. Finne and J.A. Kearns. 1959. The use of recording spectrophotometer for the detection of acid phosphatases in seminal stains. *J. Crim. Law. Criminol. Police Sci.* 49: 608-611.
- Olliver d'Angers and Barruel. 1826. De taches observées sur un linge dans un cas de médecine legale. *J.Chim. Med. Pharm. Toxicol.* 2: 565-568.
- Orfila, (M.J.B.). 1827. Du sperme, considéré sous la point de vue médico-legal. *J. Chim. Med. Pharm. Toxicol.* 3(10): 469-480

Orfila, (M.J.B.) 1839. Réfutation du mémoire de M. Devergie sur la suspension. *Ann. Hyg. Publique Med. Leg.* 21: 466-473.

Owen, G.W. and K.W. Smalldon. 1975. Blood and semen stains on outer clothing and shoes not related to crime: report of a survey using presumptive tests. *J. Forensic Sci.* 20: 391-403.

Perez de Petinto y Alonso Martinez, J. 1953. Nuevo método para la determinación de las manchas espermáticas. *Rev. Med. Leg. (Madrid)* 8: 483-487.

Pinto, F.C. 1959. Rape. For the defnse... Acid Phosphatase. *J. Forensic Med.* 6: 147-159.

Pollack, O.J. 1943. Semen and seminal stains. *Arch. Pathol.* 35: 140-196.

Posner, C. 1907. Die Barberiosche Reaktion auf Sperma. *Z. Urol.* 1: 47-50

Puranen, U.H. 1936. Eine neue mikrochemische Methode zur Identifizierung von Sperma. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* 26: 366-381.

Rasmussen, M.P.S. 1945. Un nouveau principe pour le diagnostic des taches de sperme sur les étoffes. *Ann. Med. Leg. Criminol. Police Sci.* 25: 110-117.

Reese, J.J. 1891. *Textbook of Medical Juris-prudence and Toxicology*, 3rd ed. P. Blackiston, Son & Co., Philadelphia.

Riisfeldt, O. 1946. Acid phosphatase employed as a new method of demonstrating seminal spots in forensic medicine. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.* 58, 80 pp.

Rosenheim, O. 1924. The insolation of spermine phosphatase from semen and testes. *Biochem. J.* 18: 1253-1262.

Sabbioni, E. Apostoli, P. Minoia, C. "Applicazioni dell ETA.AAS Zeeman nel Laboratorio Chimico e Tossicologico". Vol. II, *Matrici Biologiche - C. Minoia y S. Caroli*. Eds. Edizioni Libreria Cortini. Padova 1.990.

Schiff, A.F. 1978. Reliability of the acid phosphatase test for the identification of seminal fluid. *J. Forensic Sci.* 23: 833-844.

Sensabaugh, G.F. 1977. Identification and individualization of semen in the investigation of rape. Final Report, Grant 74N1-99-0041, Nat. Inst. Law Enforcement Crim. Just., Law Enforcement Assist. Admin. U.S. DEPT. of Justice.

Suyama, H. and H. Sawada. 1963. Die Bestimmung der menschlichen Samenflüssigkeit durch ein anti-saures Prostata-Phosphatase-Serum. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* 53: 175-185.

Takemoto, K. 1970. Mechanism of Florence's crystal formation. V. New method for detection of seminal stains. *Kagaku Keitsatsu Kenkyusho Hokoku* 23(1): 48-58 and see *Chem. Abstr.* 74: 21544 (1971).

Thoma, K., M. Koll and K. Fischer. 1959. Der papierchromatographische Nachweis von Spermin aus menschlichen Samenspuren. *Arch. Kriminol.* 124: 96-106.

Thornton, J.I. and D.J. Dillon. 1968. The identification of seminal stains by immunodiffusion on cellulose acetate. *J. Forensic Sci.* 13:262-266.

Tran Van Ky, Ph. and P. Muller. 1968. Étude de la structure antigénique du sperme humain et caractérisation de ses activités enzymatiques après immunoélectrophorese en agarose. Applications médico-légales éventuelles. *Med. Leg. Dommage Corpor.* 1: 269-281.

Tröger, H. D. and J. Jungwirth. 1974. Vergleichende Untersuchungen zur Empfindlichkeit von Ouchterlony-Verfahren and Überwanderungs-elektrophorese. Artspezfität-Immunologischer Spermanachweis. *Beitr. Gerichtl. Med.* 32: 156-158.

Walther, G. and P. Höhn. 1970. Ein besonderer Fall einer Spermaflecken-Untersuchung. *Arch. Kriminol.* 145: 106-108.

Welsch, H. and A. Lecha-Marzo. 1912. Contribution a l'étude de la microchimie du sperme. *Arch. Int. Med. Leg.* 3: 255-263.

Yano, M. 1970. Identification of semen by thin-layer chromatography in legal medicine. *Jpn. J. Leg. Med.* 24: 331-339.