



Alternativas para la tinción y diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide. Estudio en el Instituto de Medicina Legal

Lic. Lourdes María Vega Somonte*, Dra. Daisy Ferrer Marrero*

* Instituto de Medicina Legal. Ciudad de la Habana. CUBA

Resumen

Introducción:

En la Medicina Legal el estudio de los espermatozoides es un hecho frecuente, su investigación y su diagnóstico son de suma importancia para discernir problemas vinculados al Derecho Civil y Penal; resulta imprescindible su conocimiento.

Objetivos:

Seleccionar la alternativa idónea para la tinción y diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide acorde a las exigencias y condiciones actuales de la Medicina Legal en función de contribuir a la administración de justicia en presuntas víctimas de delitos sexuales.

Material y Métodos:

Investigación cualitativa en la que se realiza un análisis documental sobre el diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide; decidiéndose las alternativas de tinciones con hematoxilina y eosina y Papanicolau, con la contrastación como método.

Resultados:

Las presuntas víctimas son más frecuentes en edades entre 19 y 28, con exámenes físicos negativos de lesiones recientes y con un 50% de positividad. Se valoran las alternativas de tinción según las condiciones de visualización, el acierto diagnóstico y las condiciones de realización observándose que en la literatura no hay predominio de una sobre otra aunque los observadores seleccionados prefieren la de Papanicolau; que las discrepancias diagnósticas se vinculan más a la experiencia que a la tinción; y que es más económica y factible la utilización de la hematoxilina y eosina, respaldada por otros estudios.

Conclusiones:

Tanto la coloración de hematoxilina y eosina como la de Papanicolau pueden ser utilizadas para el diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide; recomendándose la primera, acorde a las exigencias y condiciones actuales de la Medicina Legal cubana.

Introducción

Dentro del campo de la Medicina Legal el estudio de los espermatozoides es un hecho frecuente, por lo que su investigación y su diagnóstico son de suma importancia para discernir problemas vinculados al Derecho Civil y el Derecho Penal; por lo anterior resulta imprescindible su conocimiento, no tan sólo para los médicos, sino también para los jueces, fiscales e instructores policiales, entre otros. En el quehacer cotidiano de las actuaciones médico legales, con el fin de precisar o esclarecer los delitos sexuales, los delitos de filiación y los delitos de paternidad, se realiza la búsqueda de espermatozoides aislados, tanto en manchas como unidos a otras secreciones.

Estos estudios, junto a la Antropología Forense, son las únicas líneas de investigación de la Biología que se desarrollan actualmente en el Instituto de Medicina Legal de la Habana, Cuba.

La investigación del semen, debido a limitaciones en su desarrollo, se encuentra circunscrita a la determinación citológica de la presencia de zoospermos en los casos de presuntas víctimas de delitos sexuales, bajo los criterios personales del médico actuante sin una metodología interna ni en el nivel nacional; debido a lo cual no se han podido realizar hasta el momento actual los análisis de manchas de esperma, estudio de especies y estudios de individualidad derivados de los anteriores.

Dados los elementos planteados, hemos decidido realizar este estudio para valorar la técnica de mayor utilidad a estos fines así como argumentar su selección a partir de los resultados que se obtengan.

OBJETIVOS

General.

≍ Seleccionar la alternativa idónea para la tinción y diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide acorde a las exigencias y condiciones actuales de la Medicina Legal en función de contribuir a la administración de justicia en presuntas víctimas de delitos sexuales.

Específicos.

≍ Analizar la fundamentación teórico metodológica de los enfoques contemporáneos para el diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide, adecuándolo a nuestro medio.

≍ Caracterizar el universo estudiado atendiendo a variables tales como edad, presunto delito, resultados del examen físico y diagnóstico realizado.

≍ Explorar y argumentar alternativas para la tinción citológica vaginal del espermatozoide, mediante su empleo y valoración.

Fundamentación teórica

El semen.

La vagina es un conducto muscular que conecta el cuello (cérvix) del útero con el exterior. El flujo menstrual pasa a través de ella cuando es eliminado y durante el contacto sexual (coito) alberga al pene erecto y recoge el semen eyaculado por éste en su interior. Para que tenga lugar la fecundación, los espermatozoides que contienen el semen deben pasar desde la parte superior de la vagina, a través del cérvix y del útero, para fecundar un óvulo que se encuentra en la trompa de Falopio. Las paredes de la vagina tienen una gran elasticidad; las paredes anterior y posterior se encuentran en contacto cuando está vacía, pero pueden separarse lo suficiente como para permitir el paso del niño en el momento del parto (13).

Se plantea (47) que el mecanismo de la eyaculación abarca dos reflejos: el primero vinculado al estadio de emisión de la eyaculación conduce el semen a la uretra posterior en tanto el segundo vinculado al estadio de eyección está determinado por un reflejo uretromuscular. Durante la eyaculación salen al exterior los espermatozoides conjuntamente con el plasma seminal o líquido seminal, el que está formado por las secreciones del epidídimo, de las vesículas seminales de las glándulas de Cowper y de la glándula prostática, elementos que constituyen el esperma, que es sinónimo de líquido espermático (1, 14).

Semen, del latín semen, semilla; significa líquido blanquecino, espeso, secretado por los testículos y próstata, que contiene espermatozoides, esperma (46).

El material recién eyaculado es un líquido cremoso, el volumen medio es de 3 ml (5), su color (54) característico blanco semitransparente, aspecto grumoso y opalino y el olor "sui generis"; al desecarse forma una mancha cuyo aspecto microscópico dependerá del soporte sobre el cual ha sido depositado. Por ejemplo, se señala que sobre telas absorbentes tiene un aspecto mapeado, dado por sus bordes limpios e irregulares, de color grisáceo, inodoro y áspero al tacto, lo que le comunica a la tela un aspecto de tejido almidonado; en tanto en las telas que no son absorbentes el esperma forma escamas o películas brillantes, de aspecto barnizado, semejando pincelaciones de coloidon (16, 25, 29).

Otra característica a señalar se vincula a su acidez (24), en el manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud de 1992 establece que los valores normales de pH en semen licuado se encuentran entre 7.2 y 8.0; lo que implica su ajuste comparado con la versión anterior. En la que el límite se encontraba en 7.8 en tanto en el manual clínico de 1993 el rango normal de valores se encuentra entre 7.2 y 7.8

Se describe (16) la siguiente composición bioquímica del semen:

- Glúcidos como la fructosa, ribosa, inositol y sorbitol
- Compuestos nitrogenados como gran concentración de aminoácidos libres, aminos (espermina, colina y etanolamina) y ergotionina.
- Antigénicos dados por la presencia de albúmina, dos o tres alfa globulina (una de ellas es una fosfatasa ácida y otra una glicoproteína), dos beta globulinas. De los 8 antígenos descritos en el plasma seminal, 4 son específicos del mismo; es decir que tienen especificidad de órgano.
- Enzimáticas como las fibrinolisin, aminooxidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y 5 nucleotidasa.
- Lípidos como las lectinas y los ácidos grasos (prostaglandinas).
- Minerales como el zinc y el calcio.

También se ha confirmado (7) la presencia de inmunoglobulina en el mismo, mediante el empleo de inmunosueros de caballos, antiseros humano, inmunosuero de conejo, antisemen humano y anticualostro materno.

El espermatozoide.

Término que deriva del griego: esperma; atos (semilla) y dsoidion (animalillo). Es un elemento generador microscópico, de 10 a 60 milimicras, móvil, producto específico de los testículos y elemento esencial del semen, que sirve para fecundar al óvulo. Consta (9) de cabeza, cuello (segmento intermedio) y cola; la primera se corresponde con el núcleo y la segunda se corresponde con el segmento terminal. En el interior de la cabeza se encuentra el aerosoma formado por el aparato de Golgi, que contiene hialuronidasa y proteasa, enzimas que juegan un importante rol en la fertilización (55).

Como sinónimos se recogen los términos espermo, espermatozoario, espartosoma, nemaspermo, filosoma sexual, zoospermo, y espermatozoo (45).

El espermatozoide es la célula sexual masculina originada por la espermatogénesis que (49) se produce en los túbulos seminíferos del testículo durante la vida sexual activa, como consecuencia de la estimulación de dicho órgano por las hormonas gonadotrópicas de la porción anterior de la glándula hipófisis.

La espermatogénesis se inicia en la espermatogonia que es una célula, tanto pequeña como mediana, situada en el epitelio del tubo seminífero, que también consta de una membrana limitante y células sustentaculares de Sertoli.

La espermatogonia prolifera y se diferencia, resultando células llamadas espermátides; cada una de las cuales contiene solo 23 cromosomas no pareados. El complemento de los 46 cromosomas se logra cuando el espermatozoide se combina con el óvulo durante la fertilización (6,21,22,37,39).

El examen citológico.

Desde la época de Euclides, antes de nuestra era (390 ANE) se conocen los instrumentos ópticos (53) pero no es hasta 1590 que se fabrica el primer microscopio por ZJ Janssen y H Janssen (11), instrumento al que se vincula el estudio de las células.

Entre 1716 y 1718 Van Leeuwenhoek mejora los sistemas de lentes del microscopio realizando una serie de observaciones en protozoarios, bacterias, músculos, nervios y otros; ya en 1667, En Datzig, un discípulo suyo, Luis Ham descubre los espermatozoides (25).

En este mismo siglo XVII, Robert Hook introdujo el término de célula (del griego "kitos", espacio hueco), la que resulta el punto de partida de la organización microscópica de la materia viviente y de su conocimiento surgiendo así la citología, que no es más que el estudio articulado de las células tomando a las mismas como una entidad morfológica en la estructura de los seres vivos (52). Con los progresos científicos y la introducción de nuevos métodos surgen la histoquímica y la citoquímica, la primera trata sobre la caracterización y localización de las sustancias o grupos de ellas en las células y la segunda permite la identificación de los diferentes compuestos químicos dentro de las células (36).

Es indudable que el medio indispensable de investigación de la citología es el microscopio por lo que podríamos señalar que para estudiar las células y sus componentes, ya sea a través de su conservación. Se utilizan diferentes tipos de microscopios que son (8,27):

- microscopio óptico
- microscopio de polarización
- microscopio para el contraste de fase
- microscopio de interferencia
- microscopio de campo oscuro
- microscopio de Rayos X
- microscopio electrónico

El estudio de la célula viva es complejo debido a que, generalmente, son transparentes a la luz visible; por su alto contenido en agua pero aun cuando esta se haya extraído no será evidente el contraste de transparencia para la cual se utiliza el microscopio de contraste de fase y aun mejor, el de interferencia aunque también pueden utilizarse colorantes supravitales, tales como el verde Janus B o el azul de metileno, pero los escasos detalles morfológicos no son modificados (28).

Las células también se pueden estudiar una vez muertas, mediante el método de fijación, el que reserva su morfología y composición química, manteniendo sus características similares a aquellas que poseían en vida.

Los fijadores contienen una o más sustancias que fijan las proteínas de las células o las hacen insolubles, sin llegar a la recitación; ello conlleva una separación de la fase sólida y de la fase líquida. La separación de la fase sólida se debe a las uniones entre las moléculas proteicas, lo que incrementa la estabilidad, evita la acción de las bacterias y de la autólisis, hace insoluble el contenido celular, disminuye la retracción y la distorsión e incrementa la visibilidad de los componentes celulares mediante la coloración y observación.

Nezelof plantea que el fijador ideal no existe y señala reglas generales de la fijación (33,34) que se relacionan:

- Debe ser lo más precoz posible porque producen alteraciones tisulares considerables.
- La fijación debe ser rápida.
- El líquido fijador debe ser abundante (30 ó 40 veces el volumen de la pieza, a fin de permitir cambios fáciles entre el medio intracelular y el fijador.
- La duración de la fijación depende de la naturaleza del fijador escogido, el alcohol absoluto, ácido acético glacial y formol, siendo suficiente una hora; otros como los cromados exigen varios días.
- El lavado de las piezas con agua debe ser absolutamente proscrito después del uso del fijador que contienen ácido pícrico, ya que hinchan las fibras colágenas y producen artefactos, en estos casos se hace el lavado en alcohol al 70% (3 baños sucesivos de media a una hora).

Existe una gran variedad de fijadores; entre los más frecuentes se encuentran el etanol, el ácido acético, el ácido pícrico y el formol. Existen métodos de fijación por congelación-deseccación, y congelación-sustitución, pero estos métodos sólo son utilizados en la microscopía electrónica y la auto radiografía; entre los fijadores para técnicas de microscopio electrónica se encuentran el tetraóxido de osmio, el permanganato de potasio, el formaldehído y la acroleína. (19,40).

La combinación de los métodos de examen de las células vivas y de las células fijadas es indispensable para conocer mejor la estructura celular.

Comienza así el procesamiento de las muestras (50).

La coloración sigue a la fijación, dependiendo de la selección de la sustancia colorante del fijador utilizado, del origen de la muestra y de las propiedades químicas del colorante. Los colorantes pueden ser básicos y/o ácidos, denominándose al tejido teñido por los colorantes básicos como basófilo y a los teñidos por colorantes ácidos como acidófilos; los primeros confieren a los tejidos generalmente un color azul y rojo o rosado para los segundos.

Un ejemplo típico y frecuente de esto son los colorantes de hematoxilina y eosina, que se emplean como rutina en los laboratorios. En ocasiones es necesario agregar uno o más metales al colorante para lograr la combinación de las proteínas celulares, a estas sustancias se les denomina mordientes (12,23).

Se plantea que no existe una tinción que tenga ventajas sobre otra, sino que debe utilizarse aquella con la que quien interpreta las

preparaciones esté más familiarizado (2).

A la coloración le sigue el montaje, última manipulación previa a la observación microscópica facilitándole el examen y especialmente conservar la muestra.

Para mostrar una preparación se recomienda utilizar sustancias transparentes, neutras y con un índice de refracción elevado. La sustancia más utilizada es el bálsamo del Canadá después de impregnar esta sustancia, se seca y se recubre con una laminilla fina de cristal, llamada cubreobjeto (32,35).

Este proceder se emplea cotidianamente en el Instituto de Medicina Legal con el objeto de complementar información pericial en casos de presuntas víctimas de delitos sexuales y en este trabajo participan todos los legistas, patólogos y tecnólogos de la salud en la especialidad de Citohistopatología, requiriéndose recursos del laboratorio de citohistopatología forense.

El estudio.

La composición bioquímica del semen y la morfología característica del zoospermo permite su estudio, significando que el examen microscópico para identificarlo se inició formalmente a fines de la cuarta década del pasado siglo XIX, a través de la investigación de las manchas de esperma o del líquido espermático.

Las complicadas estructuras internas del espermatozoide han sido aclaradas mediante el estudio de cortes con el microscopio electrónico de transmisión, pero debido a su forma fibrilar ondulada, ha sido difícil examinarlos enteros (15).

Boteher propone en 1865 la primera técnica a ese fin, que consiste en tratar el macerado de la mancha o el líquido con solución concentrada de fosfato sódico, se deja en reposo y se extrae el precipitado, observándose cristales de fosfatos de espermina, romboidales, bien estructurados, refringentes, fusiformes y de 15 a 25 micras de longitud. Esta reacción tiene el inconveniente de ser poco sensible (29,30).

En 1897, Florense propone una reacción, a su entender, específica para el semen humano y utiliza en su fórmula yoduro de potasio, iodo metálico lavado y agua destilada, obteniendo como resultado la presencia de cristales de color castaño amarillento, romboidales, con las extremidades cortadas oblicuamente, de tamaño variable; siendo más perfectos en tanto más pequeños.

A inicios del siglo XX, en 1905 Barberio propone también una técnica que consiste en una solución acuosa saturada de ácido pícrico, para reemplazar la de Florense. Otros autores como Bokarius (1907), J. Peset (1910), Lecha Marzo (1913), Miederland (1930) y Pérez Villamil (1934) proponen técnicas microquímicas para identificar las manchas de esperma pero por resultar positivas con otras sustancias orgánicas y negativas en otras circunstancias carecen de valor médico legal (4,30,42).

Actualmente, en los departamentos de Citología de los hospitales la técnica de elección es el Papanicolau, aunque se cita (18,38) que el método de selección de la coloración dependerá del requerimiento específico del observador y de los materiales de que se disponga; a partir de que se conoce que el número de técnicas de tinción para los espermatozoides son innumerables.

Finalmente se establece (17) que para el diagnóstico de certeza de la mancha es preciso determinar la presencia de espermatozoide íntegro, independientemente de que se logre o no la separación previa del soporte, utilizando para ello métodos de tinción y de microscopía. Llama la atención que en estas técnicas no se hace evidente el estudio a partir de un exudado vaginal, sino que se trabajan a partir del estudio de las manchas.

La prueba es la actividad que se lleva a cabo en los procesos judiciales con la finalidad de proporcionar al juez o tribunal (y en su caso, al jurado, en los procedimientos en que éste se encuentra llamado a intervenir según la legislación de cada país) el convencimiento necesario para tomar una decisión acerca del litigio. Como es natural, el juez no puede sentenciar si no dispone de una serie de datos lógicos, convincentes en cuanto a su exactitud y certeza, que inspiren el sentido de su resolución. No le pueden bastar las alegaciones de las partes. Tales alegaciones, unidas a esta actividad probatoria que las complementa, integra lo que en derecho procesal se denomina instrucción procesal. La prueba procesal se dirige, pues, a lograr la convicción psicológica del juez en una determinada dirección (13).

Las técnicas.

Se conoce (18) que el número de técnicas de tinción para los espermatozoides es variado y múltiple. Por lo trascendental que resulta un buen diagnóstico de especie de espermatozoides en Medicina Legal, el que debe ser realizado mediante la visualización microscópica de los espermatozoides, citaremos algunas de las técnicas empleadas por diferentes autores; recordando que el diagnóstico de individuo no se ha introducido aún en el Instituto de Medicina Legal.

Técnica de Corin y Stokis.

Emplea filamento de tela maculado, se tiñe durante un minuto con una solución de eritrocina amoniacal al 0.5%, coloreando de rosado a los espermatozoides; especialmente su cabeza. Es fácilmente visible a gran aumento, en tanto la visualización de las colas requiere de un diafragmado mayor (31,41).

Técnica de Mestre y Lecha Marzo (43).

El procedimiento de la técnica basada en yodo eosina fénica, combinando 0.1 g de yodo eosina y 10 ml de ácido fénico líquido, le dio excelentes resultados y a su juicio resulta el de elección para la práctica diaria del laboratorio debido a su sencillez. Separados algunos milímetros de fibras de la zona más sospechosa, se colorea el portaobjeto con una capa de reactivo; al cabo de 1 minuto se absorbe el reactivo con papel de filtro, se añade una gota de eipanal, se disocian las fibras y se coloca la lámina cubreobjeto. Aparecen los espermatozoides teñidos de rojo, más intensamente las cabezas que las colas. Las fibras del tejido apenas toman un ligero tinte, lo que no impide el contraste de los zoospermos (48).

Técnica de Baechi (31).

Tiñe con fuscina ácida (en una solución al 1% de fuscina ácida y de azul de metileno a partes iguales) combinada con 40 partes de agua clorhídrica; decolora con agua clorhídrica al 1% y deshidrata con alcohol. El tejido queda incoloro y los espermatozoides resaltan en color rojo violáceo y las colas en azul. Si son manchas muy antiguas, se recomienda macerarlas durante 24 horas en agua amoniacal. No hay experiencia de su utilización en exudado vaginal, solo levantamientos en textiles.

Técnica de Muller (31).

Se fija la mancha en formol al 5%, se colorea con eritrosina amoniacal y se observa con objetivo de gran aumento o de inmersión; lo que equivale a requiere de gran magnificación para su observación e identificación.

Actualmente en los departamentos de citología vaginal de los hospitales la técnica de elección es el Papanicolau; su selección como coloración a estos fines depende del requerimiento específico del médico o del investigador y de los recursos disponibles (38).

Su importancia.

Trabajos recientes hacen referencia a diferentes investigaciones que se realizan para identificar manchas de esperma o líquido seminal y así establecer un diagnóstico genérico, un diagnóstico de especie, un diagnóstico de individuo. El diagnóstico citológico vaginal de espermatozoide es una prueba de certeza y constituye un testimonio acusador irrefutable (29) en casos en que se investiguen presuntos delitos sexuales, lo que justifica que resulte de sumo interés en Medicina Legal.

Lo anterior no niega que el estudio forense (3) de muestras biológicas a través de determinaciones de ADN ofrece una evidencia vital en las investigaciones criminalísticas contemporáneas después de un adecuado examen físico donde se obtengan las muestras adecuadas para el análisis en los delitos sexuales, considerándose como tal a todos aquellos actos (26) que reconocen en su génesis el instinto sexual o expresan actos libidinosos, lascivos, injuriosos, obscenos, que traducen una actividad sexual y una satisfacción erótica (20). El Código Penal cubano los agrupa en el título XI (10).

Algunos autores como Gisbert y Simonin señalan que la tercer parte de los peritajes realizados en la clínica medico legal se debe a delitos sexuales, en Cuba alrededor de una cuarta parte de los servicios que se prestan en vivos, obedece a radicaciones por estos tipos de delitos (26).

Material y métodos

Se realiza un análisis documental a partir del empleo del análisis y la síntesis durante la revisión bibliográfica planteada sobre el tema; en particular en lo referente al diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide.

Al concluir esta etapa del trabajo, se definen cuáles tinciones son recomendadas y recomendables y a partir de su adecuación al medio se decide el empleo de la coloración con hematoxilina y eosina y la coloración de Papanicolau.

Para el resto del trabajo se considera como universo del estudio a las presuntas víctimas femeninas de delitos sexuales que han sido remitidas por la autoridad competente al Instituto de Medicina Legal durante el mes de abril del año 2004; en las que se presume por los antecedentes y los resultados del examen físico la existencia de una eyaculación de data inferior a 48 horas entre el hecho y la toma de la muestra, independientemente de la edad y del aseo genital que se haya realizado.

Se decide aplicar el estudio sólo a presuntas víctimas del sexo femenino por estar representadas éstas con mayor frecuencia (51) y ser más fácil su valoración diagnóstica.

El examen médico se realiza acorde a los requerimientos legales y científicos de la actuación.

A la obtención de la muestra se procede durante el examen genital, cuyas características son diferentes en uno y otro sexo. En el caso que nos ocupa se coloca a la presunta víctima en posición ginecológica y se toma muestras de exudado vaginal a partir del uso de un espéculo con la aplicación de un hisopo de algodón animado de movimientos rotatorios, recogiendo las secreciones presentes. Al retirar el hisopo, se extiende el material en doble muestra sobre láminas portaobjetos debidamente identificadas. La extensión puede ser de forma circular o longitudinal, según el criterio del perito actuante.

Rápidamente se colocan las láminas con el material extendido en un couplin con tapa conteniendo como fijador alcohol absoluto en cantidad suficiente para cubrir las láminas durante 24 horas, período tras el cual se trasladan al laboratorio de citohistopatología forense junto al modelo de solicitud contentivo de los datos pertinentes; teniendo la precaución de verificar la coincidencia de estos datos identificativos.

Las láminas ya fijadas y en el laboratorio se colorean con ambas técnicas de tinción seleccionadas: hematoxilina-eosina y Papanicolau.

Al concluir la coloración con el empleo de ambas técnicas se procede a su montaje con bálsamo del Canadá y se archivan una vez realizado el diagnóstico según las normas de trabajo vigentes en el laboratorio.

Es imprescindible tener presente que esta actividad, como cualquier otra de este tipo, requiere de meticulosidad en el examen, la obtención de la muestra, la identificación, la cadena custodia, la fijación, la coloración y el montaje; independientemente de que el diagnóstico al que corresponde el informe pericial que se anexa como parte del peritaje forma parte del proceso judicial.

Las 28 muestras que corresponden al universo de trabajo se diagnostican en las condiciones habituales por el experto, considerado como tal por los 25 años de experiencia en la actividad, empleando para su observación en un microscopio óptico binocular marca Olympus, modelo BH2, examinándose de un extremo a otro de forma sistemática, con movimiento vertical, para causar menos fatiga ocular.

Se tienen en cuenta variables tales como edad, presunto delito, resultado del examen físico y diagnóstico a fin de caracterizar el universo. Para realizar el escrutinio se usa el mediano aumento, proponiéndose 4 categorías para clasificar los resultados de la observación microscópica en:

- Positivo
- Negativo
- Dudoso
- No útil para diagnóstico

Considerándose positivo aquel caso en que se observan como mínimo un espermatozoide íntegro; negativo cuando no se observa espermatozoide íntegro ni tampoco cola ni cabeza, dudoso donde se aprecian sólo cabezas, y no útil cuando por dificultades técnicas durante el proceso (obtención de la muestra y fijación) se interponen artefactos que impiden la interpretación diagnóstica.

Para la valoración de ambas alternativas de tinción se consideran tres variables referidas a:

- ⚡ Condiciones de visualización
- ⚡ Acierto diagnóstico

≠ Condiciones para su realización

Al considerar la variable visualización se tienen en cuenta las valoraciones cualitativas de los participantes y los elementos que aporta la literatura.

Para la evaluación del acierto diagnóstico se seleccionan dos observadores con experiencia previa en la identificación de espermatozoides a los que se entregan, indistintamente, láminas teñidas con una u otra coloración correspondientes a los 12 casos positivos. Se tiene en cuenta que estos observadores participen a ciegas, ignorando el resultado y a su vez que la observación se realice alternativamente en diferentes casos; de forma tal que cada observador estudia la tinción de hematoxilina y eosina en 6 casos y la de Papanicolau en los 6 casos restantes para obtener información cruzada que permita la evaluación de aciertos y desaciertos según la observación y la tinción empleada.

En la valoración de las condiciones para su realización se tiene en cuenta la experiencia previa conocida a través del análisis documental realizado, los requerimientos en cuanto a reactivos y tiempo de cada una de ellas, las condiciones del laboratorio donde se realiza la investigación y el criterio personal de la autora.

Una vez obtenidos los resultados de las tres variables consideradas se logra dar salida al objetivo general propuesto.

La información así obtenida se refleja en la encuesta diseñada a tal efecto donde se contemplan todas las variables cualitativas concebidas para el desarrollo del trabajo a fin de lograr el almacenamiento de la información la cual se procesa, desde el punto de vista estadístico en tablas de frecuencia. Se presentan, en tablas y gráficos los resultados; elaborándose el documento con un procesador de textos (Word para Windows XP).

Se hacen ilustraciones y la bibliografía consultada para la realización estructural del trabajo se acota según orden alfabético.

Resultados y discusión

Se realiza un análisis documental a partir del empleo de los métodos de análisis y síntesis durante la revisión bibliográfica efectuada sobre el tema; en particular en lo referente al diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide; obteniéndose la información que aparece recogida en el capítulo referente a la Fundamentación Teórica y que sirve también de sostén a la discusión de los resultados. Resulta evidente que en general los criterios de selección de tinciones son variables atendiendo al objeto de la búsqueda, a las características del observador y a la factibilidad de su realización; por lo que, al concluir esta etapa del trabajo, se decide el empleo de la coloración con hematoxilina y eosina y la coloración de Papanicolau; a fin de discernir de entre ellas, la recomendada según el objetivo general propuesto por la autora.

Para la caracterización del universo constituido por 28 examinadas a solicitud de la autoridad competente, se tienen en cuenta las variables mencionadas, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla No. 1.-

Caracterización de las presuntas víctimas según grupo de edades		
Grupo de edades	No.	%
Hasta 18	07	25
19 a 28	14	50
29 a 38	05	17.9
39 a 48	02	7.1
49 a 58	00	-
59 a 68	00	-
69 y más	00	-
TOTAL	28	100

Se consideran independientemente las presuntas víctimas infantiles (hasta 18 años) y las restantes se agrupan con intervalos similares hasta 69 en que nuevamente se deja abierto el rango. Llama la atención el hecho de que el mayor número de examinadas (50%) corresponde al grupo entre 19 a 28 años, coincidiendo con edades que favorecen conductas proclives a la existencia de estos hechos.

Tabla No. 2.-

Caracterización de las examinadas según presunto delito investigado		
Presunto Delito	No.	%
Violación	25	89.2
Abusos lascivos	03	10.8
TOTAL	28	100

(Gráfico 1)

El universo está representado fundamentalmente en presuntos delitos de violación (89.2%); causal por la cual se justifica el peritaje solicitado en estos casos. En el caso en que se presumen abusos lascivos se supone que no haya lesiones ni se encuentre positividad alguna en el examen realizado, aunque el instructor tiene la potestad de indicar la investigación.

Tabla No. 3.-

Caracterización de las presuntas víctimas según resultado del examen físico

Lesiones	No.	%
Recientes	11	39.3
Antiguas	16	57.1
Ausentes	01	3.6
TOTAL	28	100

(Gráfico 2)

En relación con el resultado del examen físico, se consideran lesiones recientes aquellas tales como desfloración, erosiones y equimosis, entre otras; lesiones antiguas la desfloración ajena al hecho que se investiga y la ausencia de lesiones cuando se trata de presuntas víctimas no desfloradas. Puede apreciarse que el mayor porcentaje (60.7%) de las presuntas víctimas examinadas presenta lesiones antiguas, que no guardan relación con el hecho investigado.

Tabla No. 4.-

Caracterización de las examinadas según resultado del diagnóstico citológico

Diagnóstico	No.	%
Positivo	12	42.8
Negativo	11	39.7
Dudoso	03	10.3
No útil	02	7.2
TOTAL	28	100

(Gráfico 3)

Según está descrito en Material y Método se procede a la realización del diagnóstico citológico en la forma habitual, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla No. 4 donde se aprecia una distribución prácticamente uniforme entre citologías negativas y positivas; aun cuando si añadiéramos a estas últimas las dudosas en que sólo se visualizan cabezas, estaríamos en presencia de un 50% de positividad, a pesar de los resultados del examen físico.

Para la valoración de ambas alternativas de tinción se tiene en cuenta la literatura y su empleo; considerándose las 3 variables planteadas.

Como resultado de la revisión bibliográfica puede afirmarse que no hay coloración más indicada que aquella que provea condiciones adecuadas de visualización del objeto de estudio y en la que el observador se sienta cómodo al realizarla; debiendo señalarse que los observadores participantes manifiestan sentirse mejor con el empleo de la técnica de Papanicolau.

Se entregaron 12 láminas cruzadas a 2 observadores según los requerimientos previstos en Material y Método, obteniéndose los siguientes resultados.

Resultados de la observación

Identificación	Hematoxilina Eosina		Papanicolau	
	Observador 1	Observador 2	Observador 1	Observador 2
1	P			N
2	N			P
3	N			N
4	N			P
5	N			P
6	N			N
7		P	P	
8		P	N	
9		P	P	
10		N	N	
11		N	P	
12		P	N	
TOTAL	1P 5N	4P 2N	3P 3N	3P 3N

El observador No. 1 encontró menor positividad (4 casos) que el observador No. 2 (7 casos), llamando la atención que el observador No. 1 encuentra su mayor positividad a expensas de la coloración de Papanicolau (3 de 4 casos positivos) en tanto el observador No. 2 lo hace a expensas de la coloración con hematoxilina eosina (4 de 7 casos positivos).

Como puede apreciarse hay solo 5 casos (17.9%) en los que hubo coincidencia diagnóstica entre ambos observadores, de los cuales coinciden dos en positividad y tres en negatividad.

Todos estos datos sugieren que no se debe aceptar, de entrada, que sea una u otra la coloración que se seleccione ya que son muy variados y de poca significación los resultados descritos; pudiendo estar en relación con la mayor o menor experticia de los observadores, independientemente de que se seleccionaron, precisamente, a partir de su experiencia en estas observaciones.

Es por ello, que se decide comparar estas observaciones con el diagnóstico de experto realizado en estos 12 casos que, por ser

positivos, se sometieron a consideración de los observadores a fin de evaluar este requisito de la selección de la coloración, establecido por la autora.

Resultados de la comparación con el criterio de experto			
Identificación	Hematoxilina Eosina	Papanicolau	Criterio diagnostico
1	P	N	P
2	N	P	P
3	N	N	P
4	N	P	P
5	N	P	P
6	N	N	P
7	P	P	P
8	P	N	P
9	P	P	P
10	N	N	P
11	N	P	P
12	P	N	P
TOTAL	5P 7N	6P 6N	12P

Si se tiene en cuenta que los observadores ignoraban el resultado positivo de las láminas sujetas a estudio y el resultado obtenido de sus observaciones, independientemente de cual observador actuó, el hecho de existir una coincidencia diagnóstica de alrededor de un 50% en cualquiera de las coloraciones, indica que ambas pueden utilizarse atendiendo a estos resultados y se reafirma que las diferencias están influidas mayormente por la experiencia.

En la valoración de las condiciones para su realización se tiene en cuenta la experiencia previa conocida a través del análisis documental realizado, los requerimientos en cuanto a reactivos y tiempo de cada una de ellas, las condiciones del laboratorio donde se realiza la investigación y el criterio personal de la autora; tomándose como referencia el trabajo de Salazar Pérez M y colaboradores (44) en el que se ha tomado una experiencia de un número considerable de casos de citología vaginal durante el pesquisaje del cáncer cérvico uterino concluyéndose que la introducción de la coloración con hematoxilina y eosina no implica errores diagnósticos y donde además se muestra cuan más económica es esta como un elemento que justifica su empleo en las condiciones actuales de nuestro país.

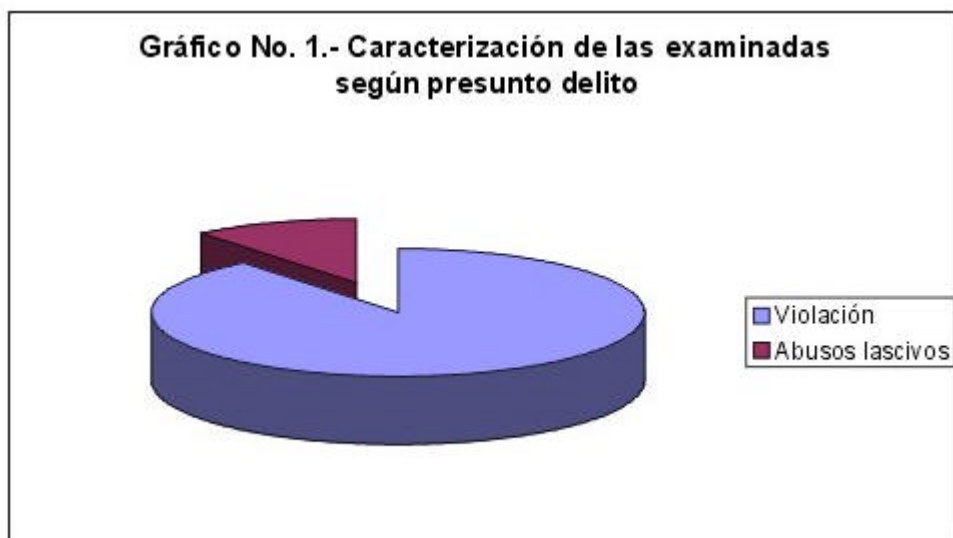


Gráfico No. 1.- Caracterización de las examinadas según presunto delito

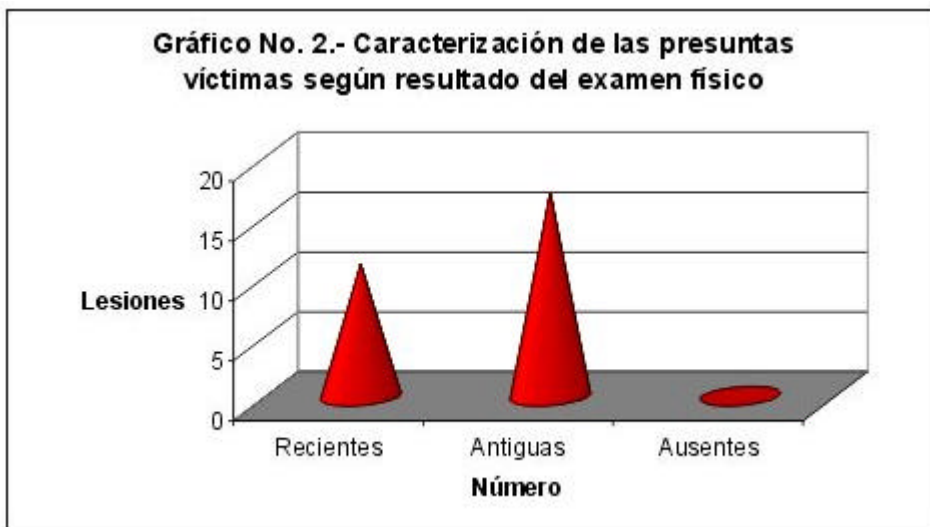


Gráfico No. 2.- Caracterización de las presuntas víctimas según resultado del examen físico

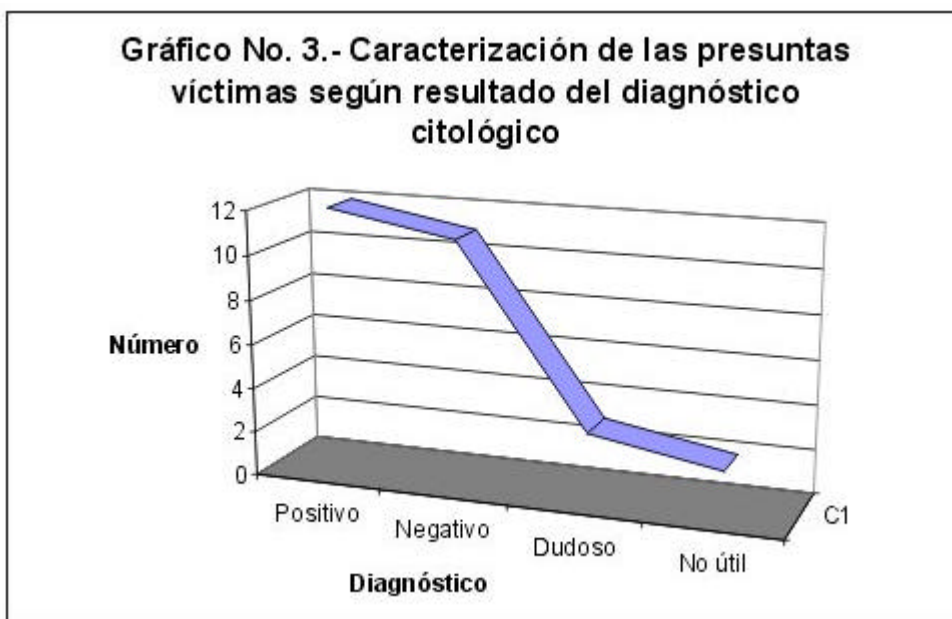


Gráfico No. 3.- Caracterización de las presuntas víctimas según resultado del diagnóstico citológico

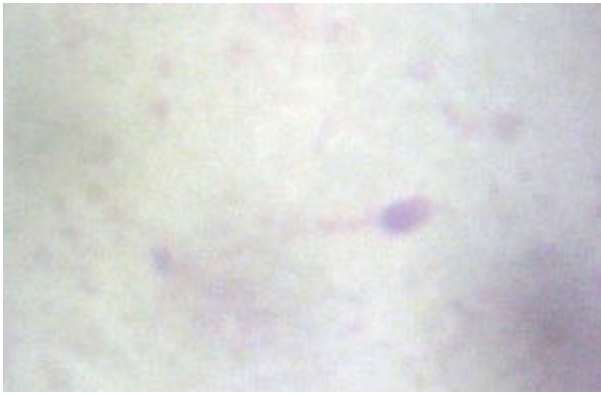


Fig.1 -



Fig.2 -

Conclusiones

- ⌘ El análisis de la fundamentación teórico metodológica de los enfoques contemporáneos para el diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide, adecuándolo a nuestro medio, permite afirmar que no hay técnica de coloración que supere a otra siempre y cuando cumpla los requerimientos para su realización y el observador se sienta satisfecho con ella.
- ⌘ El universo estudiado se corresponde en gran medida con mujeres entre 19 y 28 años de edad, en las que se presumió fueran víctimas de delitos de violación, con examen físico que reflejaba lesiones antiguas y en las que hubo alrededor de un 50% de positividad en el diagnóstico realizado.
- ⌘ El empleo de 2 alternativas de tinción con la metodología seleccionada por la autora indica que hay correspondencia entre los aportes de la literatura y el resultado de las observaciones en el hecho de que ambas pueden utilizarse indistintamente; lo que no es así en la referencia y experiencia del observador, que difieren.
- ⌘ A pesar de que se concluye que tanto la coloración de hematoxilina y eosina como la de Papanicolaou pueden ser utilizadas con resultados aceptables para el diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide, se recomienda el empleo de la primera, acorde a las exigencias y condiciones actuales de la Medicina Legal en función de contribuir a la administración de justicia en presuntas víctimas de delitos sexuales.

Bibliografía

1. - Anderson JR. Patología de Muir. Compendio de Anatomía Patológica y Patología General. Décima edición. Editorial Espaxs. Barcelona. España. 1977; 995-999

- 2.- Angeles Angeles A. Biopsia por aspiración con aguja delgada. Angeles Editores SA de CV. México. 1994; 14
- 3.- Ansell R. [Securing evidence after sexual offences is an important task for physicians. Increasing severity of crimes and use of DNA analyses necessitate higher quality standards]. Statens kriminaltekniska laboratorium, Linköping. Lakartidningen. 1998 Oct 14; 95(42): 4626-8, 4630-4631
- 4.- Baltasar V. Manual de Medicina Legal. Sexta edición. Editorial Salvat. Barcelona Buenos Aires. 1947; 451
- 5.- Bidot Fernández A. Características biológicas de la esperma de sementales bovinos en condiciones subtropicales. Tesis para la obtención del grado de Candidato a Doctor en Ciencias. Ciudad de la Habana. Mayo 1976
- 6.- Busto Hernández C. Espermatogénesis, valor diagnóstico del espermograma. Trabajo par optar por el título de especialista de primer grado en Laboratorio Clínico. Ciudad de la Habana. 1975
- 7.- Catarama Peñate M y Sierra Zequera C. El Líquido seminal en pacientes normales y azoospermicos. Su estudio inmunológico. Rev. Cub Med Trop; 1972 En -Abr; 24(1):5-9
- 8.- Clavera JM. Teoría y manejo del microscopio. Su aplicación en la clínica. Editorial Salvat. Barcelona Buenos Aires. 1942; 15-63
- 9.- Coaig M y colaboradores. Spermatozoon Decapacitation Factor (DF) in human seminal plasma. The Society for Experimental Biology and Medicine. 1968; 129:446 -448
- 10.- Código Penal (Ley No. 21 de 15 de febrero de 1979). Delitos contra el normal desarrollo de las relaciones sexuales, la familia, la infancia y la juventud. 1979; 190-199
- 11.- Cohn N. Citología. Editorial Médica Panamericana. 1977; 32-47
- 12.- Ibid; 150
- 13.- Encarta. Biblioteca de Consulta. Microsoft Encarta. 2003
- 14.- Ekkehard WJ and Chen HP. Preparation of sperma free seminal plasma from human semen. Fertility and sterility. Jan 1975; 26:1 5
- 15.- Fujita T; Tokunaga J; Inque H. Atlas de Microscopía Electrónica en Medicina. Editorial Espaxs. Barcelona. España. 1972; 92
- 16.- Gisbert Calabuig JA. Medicina Legal y Toxicología. 4ta. edición. Masson-Salvat. Ediciones Científicas y Técnicas SA. 1991; 991
- 17.- Ibid ; 993
- 18.- González Loredo MC. Tesis para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Medicina Legal. Ciudad de la Habana. Cuba. 1986
- 19.- González R. Técnicas de microscopía electrónica en Biología. 1969; 29-43
- 20.- Guía del Programa Teórico de Medicina Legal. Décima edición. Sexología. Departamento de Medicina Legal. Ciudad de la Habana. 1977
- 21.- Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. Cuarta edición. 1981; 997-1004
- 22.- Guyton AC. Tratado de Fisiología Médica. Sexta edición. 1984; 1170-1176
- 23.- Ham AW. Histología. Segunda edición. Editorial Científico Técnica. Ciudad de la Habana. Cuba. 1953; 6-48
- 24.- HaugenTB; Grotmol T. pH of human semen. Int J Androl. 1998 Apr; 21(2): 105 -108
- 25.- Lancis y Sánchez F. La Medicina Legal y el laboratorio de hace un siglo. Lex. Mar 1943; 23-24
- 26.- Colectivo de autores. Lecciones de Medicina Legal. Editorial Ciencias Médicas y Editorial Pueblo y Educación. Cuba. 1999; 124-125
- 27.- Leeson CR; Leeson T. Histología. Editora Revolucionaria. Instituto del Libro. 1971; 4-6
- 28.- Ibid 7-9
- 29.- López Gómez L. Técnica Médico Legal Criminalística. Editorial Saber. Valencia. 1953; 2:149
- 30.- Ibid; 150-151
- 31.- Ibid; 166 -168
- 32.- Martínez Alegret; García DF. Manual Práctico de Laboratorio de Biología Celular. 1948; 19
- 33.- Nezelof C; Hinglais N. Técnicas microscópicas. 1960; 39-43
- 34.- Ibid; 49
- 35.- Ibid; 78-155
- 36.- Norminski R. Citología General. Quinta edición. 1948; 72 -85
- 37.- OMS. Bioquímica y microbiología de los órganos genitales femeninos y masculinos. Ginebra. 1965; 313:5-6
- 38.- OMS. Laboratory Manual for the examination of human semen. Cervical Mucus Interaction. 1980
- 39.- Phillip D. Espermatogénesis. 1974; 1-68
- 40.- Pujiula J. Citología. Tercera Edición. Editorial "TP Cat Casals". 1953; 76-82
- 41.- Rojas N. Medicina Legal. Cuarta Edición. El ateneo. Buenos Aires. pp 341-343
- 42.- Rojas N. Medicina Legal. Cuarta edición actualizada. El Ateneo. Buenos Aires. 1983; 341-343
- 43.- Royo Villanova R; Aznar B; Piga B. Lecciones de Medicina Legal. Volumen I. pp 476
- 44.- Salazar Pérez M y colaboradores. Empleo de la técnica de coloración de hematoxilina eosina para la citología vaginal en época de austeridad. Trabajo Premio en el Forum de Base del Hospital "General Calixto García". Ciudad de la Habana. Cuba. 2004.
- 45.- Salvat. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. Décima edición. Salvat. Barcelona. 1972; 399
- 46.- Ibid; 969
- 47.- Shafik A. The mechanism of ejaculation: the glans-vasal and urethromuscular reflexes. Arch Androl. 1998 Sep -Oct; 41(2): 71-78
- 48.- Simonin C. Medicina Legal Judicial. Segunda edición. Editorial Jims, Barcelona. 1966; 904-907
- 49.- Smith D. Urología General. Ediciones Revolucionarias. Instituto del Libro. Ciudad de la Habana. 1979; 379-387
- 50.- Técnicas de Laboratorio de Anatomía Patológica. Ciudad de la Habana. Tomo III. 1971; 30-37
- 51.- Valdés Carrera LS. Consideraciones médico legales sobre los delitos sexuales. Trabajo para optar por el título de especialista de primer grado en Medicina Legal. Ciudad de la Habana. 1982
- 52.- Vega G. Citología. Editora Revolucionaria. Ciudad de la Habana. 1982; 1
- 53.- Ibid; 4
- 54.- Venegas Gonzalez AL. Huellas Forenses. Primera edición. Biblioteca Jurídica. Colombia. 2000; 42
- 55.- Wolf B; Woff H. Ultrastructure of sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen.

Preservation. Int J Fertility. 1974; 19:217-223

Web mantenido y actualizado por el [Servicio de informática](#) uclm. Modificado: 29/09/2005 21:56:28