

Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense

Forensic investigation of semen in sexual assault victims by Forensic Laboratory

Sergio Emilio Quispe Mayta¹, Silvia Tarifa Espinoza², Rubén Solíz Pacheco³, Armando Sierra Gareca⁴

¹ Laboratorio de Biología Forense, Instituto de Investigaciones Forenses, Ministerio Público. La Paz, Bolivia

² Colegio de Abogados. Facultad de Derecho, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

³ Medicina Forense, Instituto de Investigaciones Forenses, Ministerio Público. La Paz, Bolivia

⁴ Dirección Nacional Medicina Forense, Instituto de Investigaciones Forenses, Ministerio Público. Sucre, Bolivia

Dirección para correspondencia: Sergio E. Quispe Mayta. Laboratorio de Biología Forense. Instituto de Investigaciones Forenses. Calle Indaburo y Yanacocha N° 945. La Paz, Bolivia.

Cel: 591-71216881

E mail : sergioquispe@hotmail.com

Recibido para publicación en 5/07/10

Aceptado en 15/10/10

RESUMEN

La violencia sexual es un problema de salud pública y de justicia social. La inmediata actuación médico legal, la exploración física general y la buena colecta de indicios, son fundamentales para el diagnóstico certero por el laboratorio forense. Se evaluó durante enero 2008 a 2009 a 215 víctimas de violencia sexual por Medicina Forense y el Laboratorio Biología Forense del Instituto de Investigaciones Forenses. Se aplicaron 3 métodos de alta sensibilidad y especificidad para la búsqueda de semen: Fosfatasa ácida, espermatozoides y Antígeno Prostático Específico (PSA), el mismo que es un marcador específico del varón. La gran mayoría correspondieron a delitos de violación y homicidio (91%) de los cuales el 55% de los casos fue sobre niñas de 4 a 17 años. Se analizaron 251 indicios entre hisopados vaginales, anales y prendas colectadas de la víctima, el 28% de los indicios estaban impregnados con sangre. Se detectó presencia de semen en el 60% de las víctimas: Fosfatasa ácida (37%), espermatozoides (25%) y PSA (35%).

Palabras Clave: Violencia sexual, fosfatasa acida, espermatozoide, Antígeno Prostatico Específico.

ABSTRACT

Sexual abuse and assault is a problem of public health and social justice. The immediate procedure from Legal Medical was fundamental from accurate diagnostic for

Forensic Laboratory. During January 2008 to 2009 were evaluated 215 victims from sexual assault by Medical Forensic and Biology Forensic IDIF. To investigate semen stains were applied 3 methods from high sensibility and specificity: Phosphatase acid, spermatozoa, and male specific marker Prostatic Specific Antigen (PSA). Greater part cases (91%) were violation and murder, especially children's and teenager from 4 to 17 years (55%). 251 physical evidences were analyzed from vaginal and anal swabs, clothes collected from offended victims. Seminal fluid was identified in 60% victims: Phosphatase acid (37%), Sperms (25%), PSA (35%).

Key Words: Sexual assault, Phosphatase acid, spermatozoa, Prostatic Specific Antigen.

INTRODUCCIÓN

La violencia sexual es uno de los problemas más graves de salud pública, de justicia social y derechos humanos, sexuales y reproductivos en América Latina y Bolivia. Se la define como la realización de todo acto sexual sin consentimiento ni deseo por parte de la víctima. Implica el uso de la fuerza y produce graves consecuencias físicas, psicológicas y sociales.¹

En Bolivia 6 de cada 10 mujeres adolescentes entre 13 a 16 años y 4 de cada 10 mujeres adultas sufrieron violencia sexual². Las víctimas provienen de todas las edades, clases sociales, etnias, religiones, culturas, ocupaciones y estratos económicos. Una característica es

que este delito se comete sin la presencia de testigos, por ello es tan difícil demostrarlo en el ámbito judicial que da preponderancia a las pruebas testificales. En casos de violación a adolescentes y menores, lo más frecuentes es que el agresor sea una persona conocida y que merece la confianza de la víctima y en muchos de los casos son miembros del grupo o entorno familiar.³ En Bolivia, sólo 2 de cada 100 mujeres que denuncian violencia sexual llegan a juicio, y de éstos, el 80% queda en la impunidad.¹ Las consecuencias de una agresión sexual pueden ser: el embarazo como producto de la violación, VIH e infecciones de transmisión sexual (ITS), por lo tanto las víctimas deben ser atendidas prontamente.

La legislación boliviana establece que corresponde al Ministerio Público dirigir la investigación de los delitos y promover la acción penal pública ante los órganos jurisdiccionales (artículo 70 del Código de Procedimiento Penal. Ley 1970). De esta manera el Instituto de Investigaciones Forenses (IDIF), según el Artículo 75 del Código de Procedimiento Penal, está facultado para realizar con autonomía funcional, todos los estudios científicos técnicos requeridos para la investigación de los delitos o la comprobación de otros hechos mediante orden judicial. En consideración a lo anterior se hace necesario que los órganos de procuración de justicia en Bolivia tengan herramientas suficientes para el estudio científico de la investigación de los delitos sexuales.

En la presente investigación se realizó la evaluación de diferentes técnicas científicas forenses para el estudio de fluido seminal en casos de violencia sexual.

Indicios más frecuentes en la investigación de agresiones sexuales. La colección de los indicios se obtienen a partir de la víctima en hisopados vaginales, hisopados anales, secreciones vaginales, pelos y manchas. Estos indicios se someten a las tres pruebas siguientes:

Pruebas de orientación y confirmación en la pesquisa de restos seminales. El semen es el fluido masculino de mayor importancia como vestigio en los casos de delitos sexuales. Es líquido de aspecto lechoso, opalescente, ligeramente amarillo, con un volumen promedio de 3,5 ml. Está compuesto por espermatozoides (10%), plasma seminal (90%), leucocitos y células epiteliales; posee capacidad de fluorescencia, contiene altas concentraciones de fosfatasa ácida y de antígeno específico de próstata (proteína p30 o PSA).⁴

a) Fosfatasa Ácida (AcP): Es una enzima fosfomonoesterasa no específica, se encuentra en niveles altos en el semen, proviene de las células epiteliales de la glándula prostática. El nivel de la actividad de la fosfatasa ácida es 500 a 1000 veces más alta en el semen humano que en otros fluidos o secreciones corporales.⁵ Se ha demostrado que niveles elevados de la actividad de fosfatasa ácida persiste en el tracto vaginal después de la agresión sexual. La detección de la fuerte actividad

de la fosfatasa ácida es considerado como un rápido y confiable indicador de la presencia de semen.^{6, 7} El tiempo aproximado para la detección exitosa de la fosfatasa ácida es de 48 horas después del contacto sexual. La prueba de Phosphatesmo KM, permite una prueba rápida de identificación de manchas de semen. Una reacción positiva (coloración violeta) es un indicativo de la presencia de la enzima fosfatasa ácida.⁸

b) Espermatozoides: El espermatozoide posee una cabeza donde se localiza el acrosoma con el material genético (ADN) y el flagelo que le permite la motilidad. El ADN nos permite identificar de que individuo exactamente proviene. Se estima que en el producto normal de una eyaculación se encuentran alrededor de 60 a 100 millones de espermatozoides por mililitro de semen. Y sus acepciones son la oligozoospermia (menor cantidad de espermatozoides) y azoospermia (ausencia de espermatozoides). Siempre que la víctima no se haya realizado limpieza o aseo, posterior a la eyaculación, los espermatozoides tienen un tiempo de supervivencia, en función de la región anatómica donde se hayan depositado. Así en el fondo de saco vaginal donde es posible pesquisar espermatozoides de 5 a 7 días posteriores al acto sexual; en el canal endocervical hasta 4 días, en la región rectal hasta 65 horas, en la región anal 46 horas y en la cavidad oral de 6 a 12 horas.⁹ La pesquisa de espermatozoides en muestras de hisopados, secreción vaginal, anal, prendas, etc. mediante tinción citológica "Fast Nuclear Red", siempre será el mejor resultado como prueba definitiva de la presencia de semen. Es el mejor método forense basado en la tinción nuclear de alto contraste específico para el núcleo del espermatozoide.^{1, 5}

c) Antígeno Específico de Próstata (PSA): Es una glicoproteína producida por células de la glándula prostática en el varón, ha sido bastante caracterizada y validada por la comunidad Científica de Forenses, como un marcador específico de la presencia de fluido seminal.^{6, 10} Existen casos donde el agresor puede ser azoospermico o vasectomizado, en estos casos es muy importante de interés forense identificar fosfatasa ácida y PSA.^{11, 12} La cuantificación positiva del PSA se considera como una prueba confirmatoria de la presencia de semen. En muestras de semen el promedio de PSA es mayor a 820.000 ng/ml. Mediante el método inmunológico ELISA (análisis inmunoabsorbente ligado a enzima) de extremada sensibilidad, es posible detectar concentraciones tan bajas de PSA como 0,2 ng/ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

La actuación médico legal se realizó acorde a los requerimientos legales y procedimientos científicos. Muestras y Evidencias. Durante el periodo de enero de 2008 a enero de 2009, se analizaron a 215 víctimas de agresión sexual, de ellos 210 correspondieron a víctimas

de sexo femenino y 5 víctimas de sexo masculino. Las víctimas presentaron signos de lesiones físicas y la posible existencia de rastros seminales, los estudios fueron solicitados mediante Requerimiento Fiscal. Las víctimas fueron atendidas y evaluadas por Medicina Forense del IDIF dentro de las 2 hasta las 72 horas entre el hecho y la colecta de la muestra. Se han colectado las muestras y prendas de la víctima al momento de la agresión (ropa interior, toallas higiénicas, buzos y pantaletas), y en la escena del hecho (sábanas, cubrecamas, alfombras, etc.)

Se procesaron 251 indicios de los cuales 181 son muestras (160 muestras de: hisopado vaginal, conducto vaginal, fondo de saco vaginal; 7 muestras de exudado vaginal; 14 muestras de hisopado anal) y 70 evidencias (54 prendas interiores, 2 toallas femeninas, 8 pantaletas, 2 faldas, 4 sábanas).

Procesamiento de los indicios para la extracción de espermatozoides y PSA. Se recortó una tercera parte del hisopo o un fragmento de la evidencia de las regiones donde se observó manchas de interés forense. En el caso de indicios bastante amplios (sábanas, cubrecamas, cobertores), se utilizó luz de Wood (LUV) para localizar las manchas. Para la extracción de espermatozoides y PSA, se extrajo en una columna con agua mili-Q, se dejó sedimentar 30 a 40 minutos agitando regularmente, se centrifugó y se sembró el sedimento en una lámina para la tinción.

Pruebas de laboratorio de Biología Forense. Determinación de Fosfatasa Ácida. Se realizó la detección de la presencia de Fosfatasa Ácida (AcP) mediante el método colorimétrico Phosphatesmo KM como un método de orientación para la búsqueda de semen. Del extracto de los indicios se procedió a sembrar el sobrenadante sobre el soporte de la tarjeta de Fosfatasa Ácida. Luego de un minuto se realizó la lectura, el resultado fue positivo cuando se visualizó el cambio de coloración de incoloro a un violeta intenso.

Identificación de espermatozoides. Método de Coloración Fast Nuclear Red^{10,13,14}. A partir del sedimento de los extractos se procedió a sembrar las muestras, fijarlas y colorearlas entre 15 a 20 minutos. Se lavó con agua destilada y para el contraste se añadió la solución: ácido pícrico - índigo carmín. Se lavó nuevamente con alcohol etílico 90%, se secó y se

observó al microscopio. El resultado fue positivo cuando se observó el acrosoma del espermatozoide que se tiñe de rosa pálido y el núcleo de la cabeza de rojo intenso y el flagelo de color verde. La observación se realizó sobre un microscopio comparador LEICA, modelo DM4000B

Determinación del Antígeno Específico de Próstata mediante método ELISA. Mediante un kit de PSA, se trabajó con los cinco estándares de PSA: 1.56; 3.1; 6.25; 12.5 y 25 ng de PSA /mL; controles positivo y negativo. Los extractos de los indicios fueron sembrados en los pocillos, se incubaron a temperatura ambiente. A los 5 min se añadió el conjugado enzimático, se incubó por 1 hora. Se descartó la solución de los pocillos y se lavó con agua destilada varias veces. Se añadió la solución de sustrato y se incubó por 20 min. Se añadió la solución de parada y se realizó la lectura de las absorbancias a 450 nm de longitud de onda en el Lector ELISA, modelo ELx800.¹⁵ Se utilizaron los mismos extractos para la determinación de PSA en indicios con impregnación hemática.

RESULTADOS

Durante los periodos de enero de 2008 a enero de 2009 se ha realizado el estudio a 215 víctimas de agresión sexual, de ellos 210 de sexo femenino y 5 de sexo masculino. El 98% (210) de las víctimas correspondieron al género femenino, de estas el 55% (118) presentaban una edad entre 4 a 17 años, el 11% (23) de las víctimas registraban edades inferiores a los 12 años. Para el género masculino cuatro de las víctimas eran niños menores de 9 años.

La región donde se reportó con mayor frecuencia delitos sexuales fue en áreas rurales el 78% (169) de los diferentes municipios del país. La gran mayoría ocurrió en recintos cerrados y no en espacios abiertos. El 78% (169) de los casos se registraron en el departamento de La Paz (20% El Alto y 58% en La Paz); 8% (15) Santa Cruz; 6% (14) Beni; 3% (5) Cochabamba; 2% (4) Potosí; 1% (3) Chuquisaca; 1% (3) Tarija; no registrándose ningún caso de Pando.

Según el tipo de delito, el 85.56% (184 casos) correspondieron al delito de violación; 5.11% (11 casos) homicidio; 3.25% (7 casos) trata de seres humanos; 2.33% (5 casos) proxenetismo; 1.4% (3 casos) estupro; 1.4% (3 casos) asesinato. (Ver grafico 1)

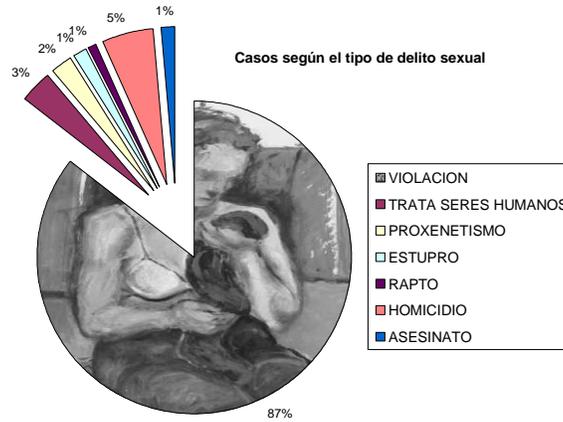


Gráfico 1. Población muestral según el tipo de delito.

Pruebas de laboratorio de Biología Forense. De un total de 251 indicios colectados, 167 correspondieron a hisopados y secreciones vaginales, 14 hisopados anales, 54 prendas interiores y 16 prendas (pantalones, faldas, toallas higiénicas). En el 28% (60 casos) de las víctimas se detectó la presencia de sangre. Se hallaron rastros de semen, resultado positivo en el 60% (130) de las víctimas y el 40% (85) con resultado negativo.

Determinación de Fosfatasa Ácida. Se detectó la presencia de la actividad de la Fosfatasa ácida en el 37%

(80 casos) en muestras de hisopados vaginales y prendas de la víctima. La prueba fue altamente sensible y específica ante la presencia mínima de semen, no así con fluidos como orina, saliva.

Pesquisa de espermatozoides. Se logró identificar en el 25% (55 casos) la presencia certera de espermatozoides, tanto en hisopados, secreciones vaginales y prendas de las víctimas (Gráfico 2).

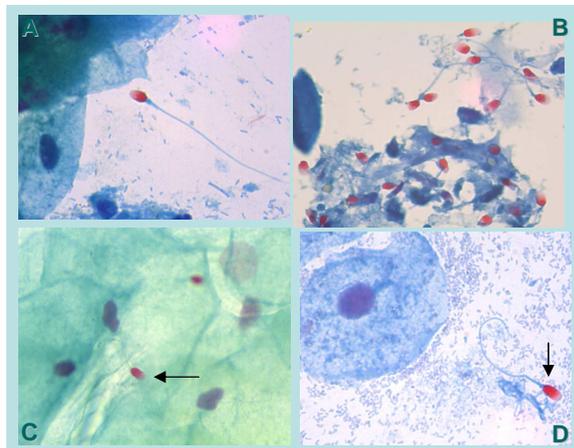


Gráfico 2: Espermatozoides observado en hisopados vaginales y prendas: A. Un espermatozoide y células epiteliales en hisopados vaginales B. Abundantes espermatozoides y leucocitos en secreción vaginal, post mortem C. Espermatozoides en muestra con sangre menstrual D. Espermatozoide donde se observa el acrosoma nuclear, célula epitelial. (Tinción Fast Nuclear Red. Objetivo 100x).

Identificación de Antígeno Específico de Próstata (PSA). En los extractos de los indicios se hallaron en 35% (75 de los casos) la presencia de PSA mediante el Inmunoensayo ELISA. Se reportaron concentraciones mínimas de 0.2 ng/mL y concentraciones mayores a 25 ng/mL de PSA.

Búsqueda de semen en indicios con impregnación hemática. Se detectaron en el 28% de los indicios la presencia de fosfatasa acida, espermatozoides y PSA.

DISCUSIÓN

La violencia sexual representa un problema de justicia social y de salud pública que daña a la persona, a la familia y a la sociedad boliviana en su conjunto.¹ La problemática de violencia sexual, hecha sus raíces sobre los factores fundamentalmente culturales, agudizados por la coyuntura de pobreza, inequidad de género y del rol que tiene la mujer dentro y fuera de la familia.¹⁶ La combinación de 3 métodos para la pesquisa de fluido seminal en indicios de violencia sexual, permitieron la detección positiva inequívoca en el 60% (130 casos). En el 37% (80 casos) se detectó la presencia de Fosfatasa Acida; a 25% (55 casos) se observaron varios espermatozoides (tinción Fast Nuclear Red); por la técnica ELISA se cuantificó PSA en el 35% (75 casos). Los resultados hallados apuntan a que las niñas y las adolescentes son más vulnerables al abuso sexual, la violencia, la prostitución y las consecuencias de las relaciones sexuales prematuras y sin protección. Los casos de violencia sexual, se acentúa sobre niñas y adolescentes, lo que en la mayoría de los casos le impide comprender que es o ha sido víctima de un delito. Trae como secuelas la diseminación de las infecciones de transmisión sexual, el VIH, la prostitución y el aborto.

REFERENCIAS

1. IPAS Bolivia. Atención a víctimas de violencia sexual. Abordaje desde el sector salud. Disponible en : www.ipas.org.2008
2. IPAS Bolivia. Marie Stopes International Bolivia. Seminario Nacional de abordaje Violencia Sexual. 2007.
3. IDIF FISCALIA GENERAL DE LA REPUBLICA. IPAS. Normas, protocolos y procedimientos. Para la atención integral de violencia sexual. La Paz, 2005
4. Stoilivic M. Detection of Semen and Blood Stains Using Polilight as a Light Source. *Forensic Sci. Int.* 1991; 51: 289
5. Gutman AB, Gutman EB. Quantitative Relations of a Prostatic Component (Acid Phosphatase) of Human Seminal Fluid. *Endocrinology.* 1941; 28: 115.
6. Sensabaugh GF. The Quantitative Acid Phosphatase Test: A Statistical Analysis of Endogenous and Postcoital AP Levels in the Vagina. *J. For. Sci.* 1979; 24.
7. Riisfeldt O. Acid Phosphatase Employed as a New Method of Demonstrating Seminal Spots in Forensic Medicine. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Supplementum.* 1996; 58: 1.
8. Kobus H.J. Improving the Effectiveness of fluorescence for the detection of semen stain on fabrics. *J For Sci.* 2002; 47(4).
9. Montoya S, Díaz D, Reyes R, *et al.* Peritaje Médico Legal en delitos sexuales: Una pauta práctica para su correcta realización. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2004; 69(1): 55.
10. Hochmeister O, Rudin UV, Borer A, Kratzer Ch, Gehrig, Dirnhofer R. Evaluation of Prostate-specific Antigen (PSA) Membrane Tests for the Forensic Identification of semen. Switzerland.
11. Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T, *et al.* Some Physico-Chemical Characteristics of Gamma-Seminoprotein – An Antigenic Component Specific for Human Seminal Plasma. *Jap J Leg Med.* 1971; 25: 322-324.
12. Blake ET, Sensabaugh GF. Genetic Markers in Human Semen: A Review. *J For Sci.* 1976; 21: 784.
13. Carson FL. *Histotechnology: A Self-Instruction Text.* American Society of Clinical Pathology. (1990), pp. 214-215.
14. *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators,* Green, F.J., Ed., Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI: 1990), p. 532.
15. Fritsche HA, Babaian RJ. Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen. *Clin Chem.* 1993; 39: 1525-1529.
16. IPAS – Bolivia. Marie Stopes International Bolivia. Memoria del Simposio Nacional. La violencia sexual, un problema de salud pública y de justicia social. 2008.