

ARTÍCULOS ORIGINALES

PESQUISA DEL FLUIDO SEMINAL EN VÍCTIMAS DE VIOLENCIA SEXUAL POR EL LABORATORIO FORENSE

Dr. Sergio Emilio Quispe-Mayta*
Dra. Silvia Guera Tarifa Espinoza**
Dr. Rubén Solíz Pacheco***

RESUMEN

La violencia sexual es un problema de salud y de justicia social, la inmediata actuación médico legal, la buena colecta de indicios fueron fundamentales para el diagnóstico certero por el laboratorio forense. Se evaluaron y validaron tres ensayos forenses para la investigación de fluido seminal en indicios de víctimas de violencia sexual. Se analizó 251 indicios colectados a 215 víctimas por Medicina Forense en el Laboratorio de Biología Forense del Instituto de Investigaciones Forenses de La Paz. Se aplicó tres métodos para la pesquisa de componentes del semen: Fosfatasa ácida, espermatozoides y Antígeno Prostático Específico (PSA). El 55% de las víctimas comprendían edades entre 4 a 17 años. El 86% de los casos correspondieron a delitos de violación. Se detectó la presencia de semen en 130 víctimas (60%). Componentes seminales individuales como la Fosfatasa Ácida en 120 víctimas (56%); espermatozoides en 55 víctimas (26%) y PSA en 130 víctimas (60%). Se detectó la presencia de fluido seminal mediante 3 ensayos forenses en el 60% de las víctimas, siendo la mayoría casos de Violación. Indicios impregnados con sangre no interfirieron en la pesquisa de semen.

Palabras Clave: Violencia sexual, fosfatasa ácida, espermatozoide, Antígeno Prostático Específico.

ABSTRACT

Sexual assault is a problem of public health and social justice, the immediate procedure, the successful collection of the physical evidence at the time from Legal Medical, were essentials to accurate investigation by Forensic laboratory. Were applied three assays to Forensic investigation of semen in evidences from sexual assault victims. 251 evidences were analyzed from 215 victims by Medical Forensic and Biology Forensic Laboratory, IDIF - La Paz to victims by Medical Forensic and Biology Forensic Laboratory, IDIF - La Paz to investigate semen components were applied 3 methods: Phosphatase acid, spermatozoa, and Prostatic Specific Antigen (PSA). 55% victims had between 4 to 17 years. 86% were rape assault cases. Seminal fluid was identified on 130 victims (60%); Phosphatase acid about 120 victims (56%); sperms in 55 victims (26%) and PSA in 130 victims (60%). Seminal fluid component was detected about 60% victims from rape assault. Blood stains don't produce interference.

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

* Bioquímico Forense, Magister en Ciencias Forenses. Laboratorio de Biología Forense

** Abogado Penalista, Diplomado en Educación Superior.

*** Médico Forense, Master en Medicina Forense. Coordinador General de Medicina Forense. Instituto de Investigaciones Forenses. Fiscalía General del Estado. Ministerio Público. Responsable: Dr. Sergio Emilio Quispe-Mayta • E-mail: sergioquispe@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Los delitos de Violencia sexual en los últimos años han tenido un incremento alarmante, principalmente la violación. Este incremento en nuestro país se ha observado principalmente en víctimas menores de edad. Los indicios biológicos dejados por el agresor sobre la víctima y en el Lugar de los hechos adquieren vital importancia por la información que pueden brindar en la investigación en especial cuando este delito se consuma sin testigos, por ejemplo en víctimas sometidas a sustancias que producen estado de indefensión como las benzodiazepinas, la cocaína y el alcohol. El hallazgo del fluido seminal en los indicios colectados por Medicina Forense, adquiere un gran valor en la prueba material. La presencia de semen en la vagina, las prendas, en otras regiones del cuerpo de la víctima, brinda valiosa información para la investigación del delito y permitir el establecer la participación de los autores. La pesquisa del semen por el Laboratorio Forense es importantísima en la investigación de los delitos sexuales como la Violación. El fluido seminal puede estar impregnado en una prenda, mezclado con sangre, secreción vaginal u otros fluidos corporales de la víctima. Las pruebas de laboratorio comprenden una gama de alternativas, pero las más eficaces son la detección de espermatozoides, la actividad de la fosfatasa ácida prostática, el Antígeno Prostático Específico.^(1, 2)

Las víctimas que asistieron a Medicina Forense del Instituto de Investigaciones Forense provienen de diferentes entornos sociales y económicos. Sólo 2 de cada 100 mujeres que denuncian violencia sexual llegan a juicio y de éstos, el 80% queda en la impunidad.^(1,2) Las consecuencias de una agresión sexual pueden ser: el embarazo como producto de la violación, infecciones de transmisión sexual, virus de VIH, 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 (Art. 70 del Código de Procedimiento Penal. Ley 1970). De esta manera el Artículo 75 CPP 4 faculta al Instituto de Investigaciones Forenses (IDIF), 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.^(2,3)

MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente investigación se ha realizado la evaluación y validación de tres técnicas científicas forenses para el estudio de fluido seminal en casos de violencia sexual. Mediante el registro de atención a víctimas y el acta de colecta de evidencias, se verificó la procedencia de la víctimas, la edad y el tipo de delito tipificado por la Autoridad Judicial del Ministerio Público.

Los hisopados vaginales, hisopados anales, secreciones vaginales y manchas, todas fueron sometidas a la identificación de: *fosfatasa ácida* como una prueba presuntiva de presencia de fluido seminal; el examen microscópico para la *pesquisa de espermatozoides* como prueba definitiva; y la identificación de *Antígeno Prostático Específico (PSA)* como prueba confirmatoria. La comunidad científica forense utiliza estos métodos para realizar la Pesquisa de fluido seminal en indicios de interés forense.

Por el periodo de un año (enero de 2008 a enero de 2009), se examinaron a 215 víctimas de agresión sexual, de ellos 210 correspondieron a sexo femenino y 5 de sexo masculino. Las víctimas fueron atendidas y evaluadas por la sección de Medicina Forense del IDIF. La actuación

médico legal se realizó acorde a los requerimientos legales y procedimientos científicos,⁽³⁾ dentro de las 2 horas hasta las 96 horas entre el hecho y la colecta de la muestra. Los estudios periciales de Laboratorio fueron solicitados mediante Requerimiento Fiscal. La sección de Medicina Forense colectó las muestras de hisopados y secreciones genitales y extragenitales, también se colectó las evidencias (prendas) de las víctimas que llevaban al momento de la agresión sexual.

Se han procesado 251 indicios de los cuales 181 fueron diversas 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, 8 pantalones, 2 faldas, 2 toallas femeninas, 4 sábanas). Procesamiento de los indicios para la extracción de componentes del semen. Se recortó una tercera parte del hisopo y un fragmento de la evidencia de las regiones donde se observó manchas de interés forense. En las prendas íntimas, sábanas u otros indicios la localización de la “mancha” se efectuó por la observación de *Fluorescencia*, mediante una lámpara de Wood con Luz Ultra Violeta a una longitud de onda de 340nm.⁽⁵⁾ Para la extracción de espermatozoides y PSA, se extrajo en una columna con agua estéril, se dejó sedimentar 40 minutos agitando

regularmente, se centrifugó y sembró el sedimento en una lámina para la tinción.

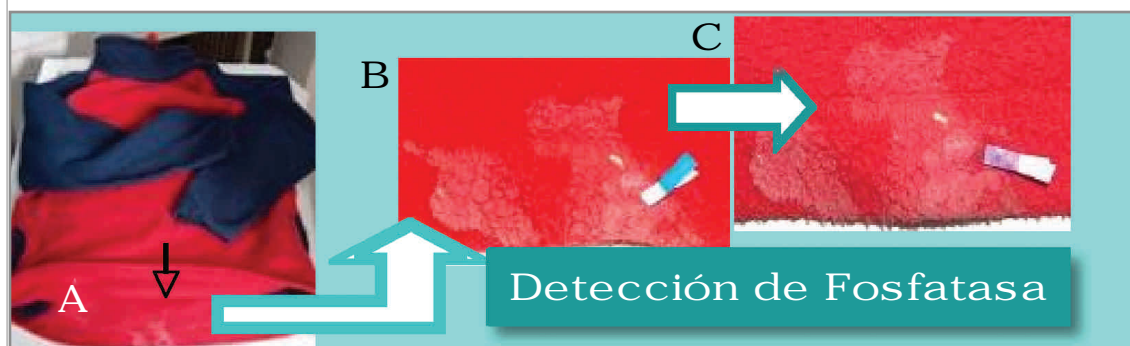
Pruebas de laboratorio de Biología Forense

- Determinación de Fosfatasa Ácida. Se realizó la detección de la presencia de *Fosfatasa Ácida* (PAC) mediante el método colorimétrico visual, *Phosphatesmo KM* como un método de orientación para la búsqueda de semen.⁽⁶⁾ Del extracto de los indicios se procedió a sembrar el sobrenadante sobre el soporte de la tarjeta de *Fosfatasa Ácida*. Se realizó la lectura visualmente, el resultado fue positivo.
- Cuando se visualizó el cambio de coloración de incoloro a un violeta intenso.^(7,8)
- Identificación de espermatozoides

Se aplicó el Método de *Coloración Fast Nuclear Red Solution*. Línea SIGMA, (USA)^(6,9) Los extractos de los indicios de la anterior fase, se procedió a sembrar, fijarlo y colorearlo por 15 minutos, se lavó con agua destilada y para el contraste se añadió: ácido pícrico - índigo carmín, se lavó con etanol 90%, se observó al microscopio con aumento de 100x. El resultado fue positivo cuando se observó el acrosoma del espermatozoide teñido de color rosado,

FIGURA N° 1

Detección de Fosfatasa ácida en manchas de interés forense a) Mancha blanquecina localizada en la parte inferior posterior de la prenda de la víctima b) Reacción de la prueba sobre la mancha c) Cambio de color observado en la prueba.



el núcleo de la cabeza de rojo intenso y el flagelo de color verde.^(10,11,12) La observación se ha realizado en un microscopio comparador LEICA, modelo DM4000B

d) Determinación del *Antígeno Específico de Próstata*

Mediante un kit de *PSA* de la línea comercial DIALAB, (Austria), se trabajó con cinco estándares de concentración de *PSA*: 1.56; 3.1; 6.25; 12.5 y 25.0 nanogramos de *PSA* por mililitro, controles positivo y negativo.^(12,13) Los extractos de las muestras y evidencias fueron sembrados en los pocillos, se incubó 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 5 veces. Se añadió el Substrato y se incubó por 20 min. Finalmente se añadió la solución de Stop y se realizó la lectura de las absorbancias a 450nm de longitud de onda en el Equipo Lector ELISA, modelo ELx800.⁽¹³⁾ (Figura N° 2). En muestras vaginales y prendas con impregnación hemática, se utilizaron los mismos extractos para la determinación de *PSA*.

RESULTADOS

Se estudió a 215 víctimas de violencia sexual, 210 de sexo femenino y 5 de sexo masculino. De estas el 55% (118) entre 4 a 17 años de edad; el 11% (23) fueron niñas de edades inferiores a los 12 años; el mayor porcentaje de víctimas fueron adolescentes de 12 a 18 años (44%); seguido de mujeres 18 a 27 años de edad (35%) (Figura N° 3). Cuatro víctimas fueron niños varones menores de 9 años.

VICTIMAS DE RELACIÓN SEXUAL SEGÚN EDAD

La región de donde se reportó denuncias con mayor frecuencia de delitos sexuales fue en áreas rurales; el 78% (169) de los diferentes municipios del país. La mayoría ocurrió en recintos cerrados y no en espacios abiertos. El 75% (169) de los casos se registraron en el departamento de La Paz (20% El Alto y 55% 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 la tipificación del delito de los casos denunciados ante el Ministerio Público: el 85.6% (184 casos)

FIGURA N° 2

Determinación cuantitativa del *PSA* por Inmunoensayo ELISA. Curva de los estándares de *PSA*

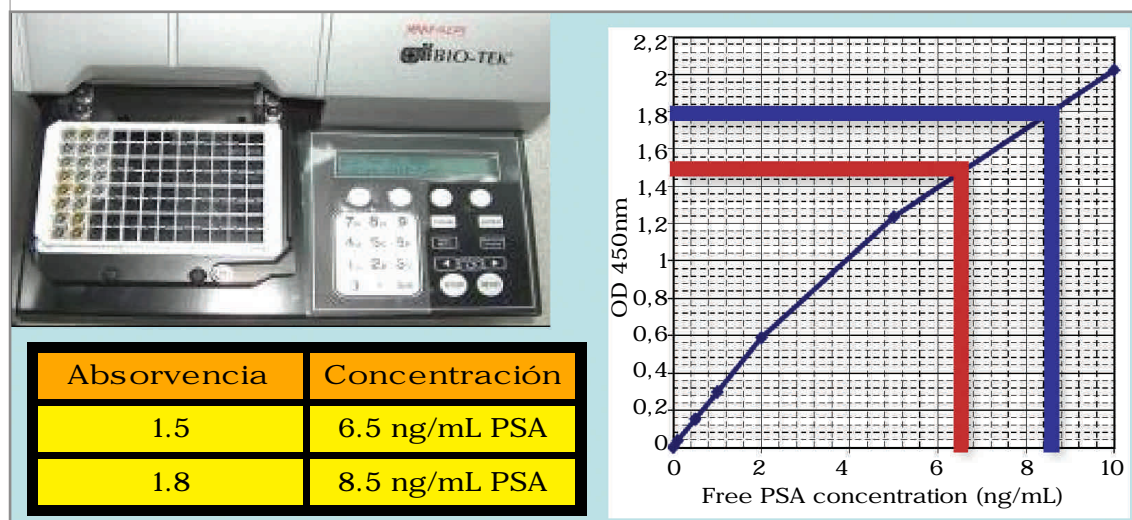


FIGURA N° 3
Distribución Porcentual de delitos sexuales según la edad de la víctima

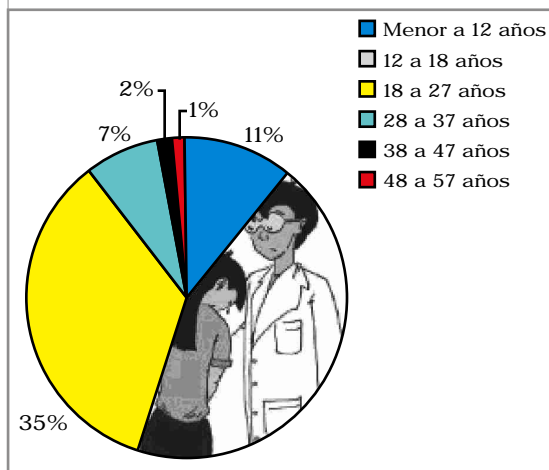
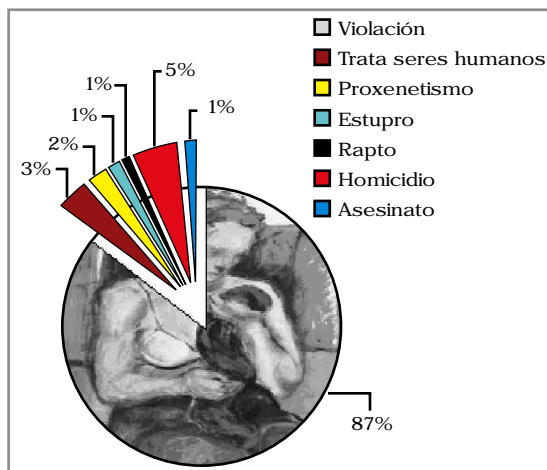


FIGURA N° 4
Clasificación de los datos según el tipo de delito denunciado



correspondieron al delito de Violación; 5.1% (11 casos) homicidio; 3.3% (7 casos) trata de seres humanos; 2.3% (5 casos) proxenetismo; 1.4% (3 casos) estupro; 1.4% (3 casos) asesinato.

CASOS SEGÚN EL TIPO DE DELITO SEXUAL

Resultados de la pruebas de laboratorio

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). Se detectó y confirmó la presencia de semen en 130 víctimas (60%) y 85 víctimas (40%) con resultado negativo. En el 28% (60 casos) de las víctimas se detectó la presencia de sangre.

Determinación de Fosfatasa Ácida.

Se detectó la presencia positiva de la Fosfatasa ácida en 120 víctimas (56%) y con resultado negativo 75 casos (44%), en muestras de hisopados vaginales y prendas. La prueba fue muy sensible y específica ante la presencia mínima de semen, no así con fluidos como orina, saliva y sangre.

Pesquisa de espermatozoides. Se identificó con resultado positivo en

55 víctimas (26%) la presencia certera de espermatozoides, en muestras de hisopados, secreciones vaginales y prendas de las víctimas (Figura N° 5), y 160 víctimas (74%) con resultado negativo.

Determinación de Antígeno Específico de Próstata (PSA). En los extractos de los indicios se detectó la presencia de PSA mediante el Inmunoensayo ELISA en 130 víctimas con resultado positivo (60%) y 85 víctimas (40%) con resultado negativo. Se cuantificó concentraciones mínimas de 0.5 ng/mL y concentraciones mayores a 25 ng/mL de PSA.

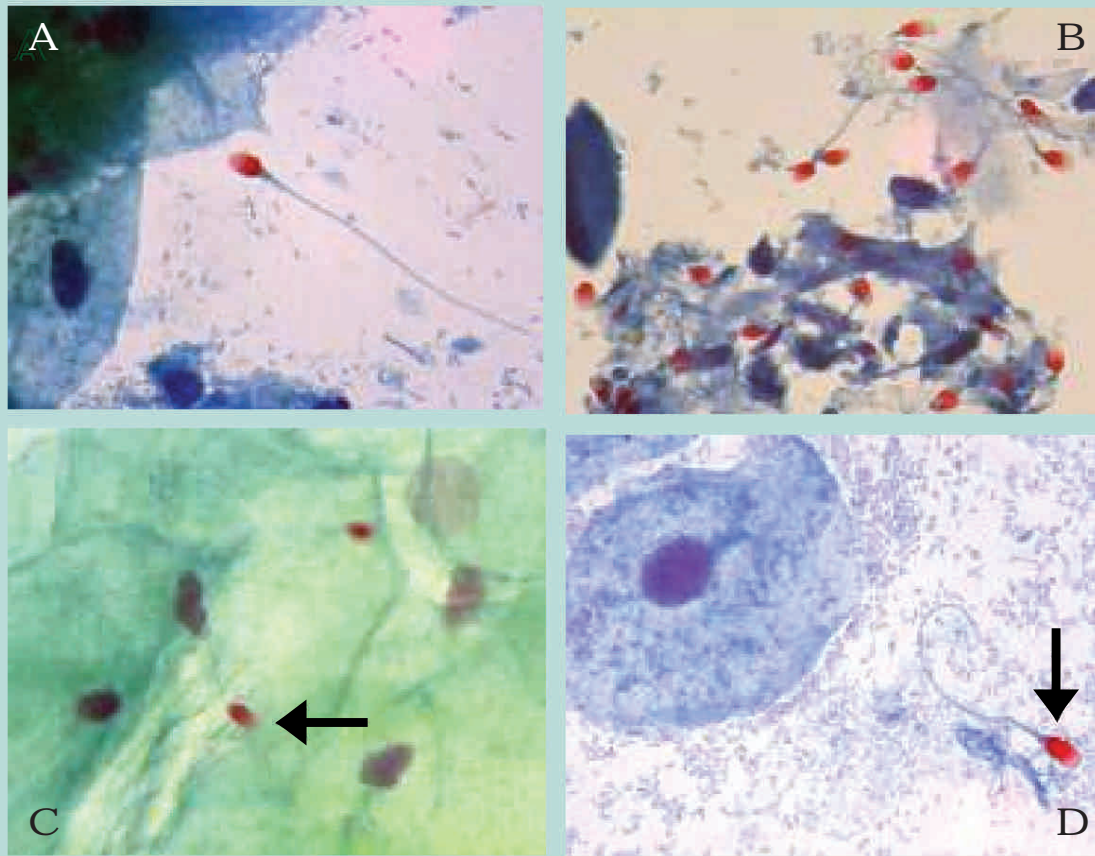
Se detectó la presencia de semen, en 70 indicios (28%) que contenían sangre de lesión genital y sangre menstrual procedente de la víctima. No se observó interferencia de la sangre en la detección de fosfatasa ácida, espermatozoides y PSA.

DISCUSIÓN

El fluido seminal es un buen marcador forense, ya que es estable por mucho tiempo, específico porque solo está presente en varones, y su detección en concentraciones mínimas.^(6,7,8) Mediante la detección de PSA mediante inmunoensayo y el respaldo de la prueba

FIGURA N° 5

Pesquisa de espermatozoides a) Un espermatozoide y células epiteliales en hisopado vaginal b) Abundantes espermatozoides en secreción vaginal, post mortem c) Espermatozoides en muestra vaginal con sangre menstrual d) Un espermatozoide donde se observa el acrosoma nuclear y una célula del epitelio vaginal.
(Tinción Fast Nuclear Red. Objetivo 100x).



de Fosfatasa Acida pueden ser empleados como pruebas confirmatorias en la detección de semen. El PSA como proteína se comporta de manera estable en las manchas de semen como en las prendas e hisopados vaginales, siendo además posible su detección inmediata en cantidades mínimas. Asimismo la especificidad de especie del PSA como tal, la hace muy específica excluyendo falsos positivos en relación con la reacción de la fosfatasa acida.

La elección de la PSA como marcador específico del semen permite afirmar su valiosa importancia en delitos sexuales, asimismo varios estudios han

determinado que su síntesis y secreción se limita a la próstata.^(4,5,8) Según la evaluación del siguiente trabajo en la prueba inmunológica para el PSA no se observó interferencias por ninguno de los materiales biológicos evaluados como sangre, orina, secreción vaginal y heces fecales. En las pruebas para la determinación de PSA y fosfatasa acida permitieron apreciar el mayor porcentaje de detección, esto confirma que estos dos métodos son bastante sensibles a la mínima cantidad de fluido seminal, en cambio para la detección positiva de espermatozoides al menos debe existir un número considerable de ellos para ser observados.^(7,8)

Finalmente un resultado negativo, no debe interpretarse como una prueba definitiva de la ausencia de la agresión sexual, en estos casos es muy probable que los agresores hubiesen utilizado un preservativo o no hayan dejado fluido seminal. Estos casos deben fortalecerse con otros exámenes forenses como: la búsqueda de pelos, saliva o sangre del agresor en la víctima, pruebas genéticas por ADN, lesiones físicas evaluadas por Medicina forense, Psicología forense, etc.

CONCLUSIÓN

Entre enero de 2008 y enero de 2009, se han evaluado a 215 víctimas de violencia sexual en Medicina Forense (210 mujeres y 5 varones). Las muestras y evidencias colectadas se han analizado en el Laboratorio de Biología Forense del Instituto de Investigaciones Forenses de La Paz.

El mayor porcentaje 90% (193) de las víctimas correspondió a niñas menores de 12 años y víctimas hasta los 27 años; el 55% (118) de ellas entre 4 a 17 años. Cuatro víctimas varones fueron niños menores de 9 años, en 3 de ellos se detectó la presencia de semen. Según la tipificación del delito: el 85.6% (184) víctimas 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. De 251 indicios colectados de las víctimas, 181 fueron muestras de hisopados vaginales y anales; 70 evidencias entre prendas interiores, toallas femeninas y pantalones.

Los 3 métodos forenses nos permitieron la detección certera y definitiva en la investigación forense del fluido seminal en indicios de víctimas de violencia sexual. Se determinó la presencia de fluido seminal en los indicios de 130 víctimas (60%).

En 120 víctimas (56%) se detectó la presencia de Fosfatasa Ácida; en 55 víctimas (26%) se observó varios espermatozoides; por el Inmunoensayo ELISA se detectó y cuantificó PSA^(15,16) en 130 víctimas (60%). Se detectó la presencia de semen en 70 muestras y evidencias (28%) que estaban impregnadas con sangre.

La prueba de la *Fosfatasa ácida* con 56% y la Determinación de PSA 60%, 8232 fueron los ensayos con mayor porcentaje de resultado positivo, además de la presencia de espermatozoides en 26% dieron certeza de la presencia de fluido seminal.^(4,6,9) La detección de la fosfatasa ácida es considerado como un rápido y confiable indicador de la presencia de semen.^(7,8,14) No se detectó presencia de semen en 85 víctimas (40%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IPAS; Marie Stopes International Bolivia. *Atención a víctimas de violencia sexual. Abordaje desde el sector salud.* Bolivia; 2008
2. IPAS; Marie Stopes International Bolivia. *Seminario Nacional de abordaje Violencia Sexual. Memoria del Simposio Nacional. La violencia sexual, un problema de salud pública y de justicia social.* Bolivia 2008.
3. IDIF - Fiscalía General de la Republica, IPAS. *Normas, protocolos y procedimientos. Para la atención integral de violencia sexual.* La Paz, 2005
4. Ministerio Público. República de Bolivia. *Código de Procedimiento Penal.*1997.
5. Stoilivic, M. *Detection of Semen and Blood Stains Using Polilight as a Light Source Forensic Sci. Int.* 1991; Vol. 51, p.289
6. Gutman, A.B. and Gutman, E.B. *Quantitative Relations of a Prostatic Component (Acid Phosphatase) of Human Seminal Fluid.* *Endocrinology*, 1941; Vol. 28, p.115

7. Sensabaugh, G.F. *The Quantitative Acid Phosphatase Test: A Statistical Analysis of Endogenous and Postcoital AP Levels in the Vagina.* *Journal. For. Sci.* 1979 Vol.24
8. Riisfeldt, O. *Acid Phosphatase Employed as a New Method of Demonstrating Seminal Spots in Forensic Medicine.* *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Supplementum*, 1996 Vol. 58, p.1
9. Montoya, D. et al. *Peritaje Médico Legal en delitos sexuales: Una pauta práctica para su correcta realización.* *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 2004; Vol. 69 (1), p.55
10. Carson, F. L., *Histotechnology: A Self-Instruction Text.* *American Society of Clinical Pathology.* 1990; pp. 214-215.
11. *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*, Green, F.J., Ed., *Aldrich Chemical Co.*, p. 532. Milwaukee, WI: 1990
12. M. Hochmeister, O. Rudin, U. V. Borer, A. Kratzer, Ch. Gehrig and R. Dirrhofer. *Evaluation of Prostate-specific Antigen (PSA) Membrane Tests for the Forensic Identification of semen.* Switzerland.
13. Fritsche, H. A. Et al. *Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen: Clin, Chem*, 39, 1529 (1993).