

MARCADORES BIOQUÍMICOS DE PLASMA SEMINAL Y SU APLICACIÓN EN EL LABORATORIO FORENSE PARA DETECTAR SEMEN EN MANCHAS

¹Bouvet B, ¹Paparella C, ²Ombrella A, ¹Pavesi A.

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. ²Facultad de Ciencias Médicas - UNR

RESUMEN

El estudio de manchas de semen tiene gran importancia en criminalística, constituye una prueba precisa y está asociada a crímenes de índole sexual. El semen está constituido por las secreciones provenientes de los testículos, el epidídimo, la glándula prostática, las vesículas seminales, las glándulas de Cowper y de Litreé. La próstata aporta al fluido seminal marcadores específicos como la fosfatasa ácida prostática (FAP) y concentraciones elevadas como el cinc con niveles cien veces superior a la concentración sérica, al igual que la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), con elevada actividad en el fluido seminal. Si bien el diagnóstico de certeza de la presencia de semen es el hallazgo de al menos un espermatozoide, la detección de componentes del plasma seminal es importante y adquiere relevancia en delitos sexuales donde participan varones azoospermicos u oligozoospermicos. El reconocimiento es sencillo en manchas seminales de reciente data, pero se complica al transcurrir el tiempo y estar sujeto a condiciones ambientales desfavorables. Nuestro objetivo fue evaluar la actividad de FAP y de LDH y los niveles de cinc en telas con manchas de semen incubadas a 56°C y su aplicación en el Laboratorio Forense. Se trabajó con muestras de semen provenientes de hombres que consultaron por infertilidad en el Servicio URHMA (Unidad de Reproducción Humana Médicamente Asistida) y cuyas muestras seminales se procesaron en el Laboratorio Mixto de Reproducción del Hospital Centenario de Rosario. Luego de completar los estudios de interés clínicos, con el remanente del plasma seminal se realizaron manchas aplicando 200µl de muestra seminal sobre trozos de lienzo (n=50) y se dejaron secar por simple exposición al aire. Se extrajeron con sacabocados fragmentos de tela de 0.5 cm de diámetro que se colocaron en tubos y se eluyeron mediante incubación a 56°C en un medio ácido compuesto por ácido sulfúrico y nítrico (1:3). Luego de centrifugar en el sobrenadante se determinó actividad de FAP y de LDH mediante métodos cinéticos a 30°C y la concentración de cinc mediante espectrofotometría de absorción atómica. Se procesó un trozo de lienzo sin semen como control. Se aplicó la prueba *t*-Student para comparar los

promedios de la actividad de FAP, LDH y concentración de cinc en las muestras respecto del control obteniéndose los siguientes resultados: FAP (U/ml): $X_M: 248.8 \pm 45.8$ vs $X_C: 2.2 \pm 0.5$ ($p < 0.0001$); LDH (U/l) $X_M: 707 \pm 114$ vs $X_C: 59 \pm 16$ ($p < 0.0001$); cinc (ug/ml): $X_M: 247 \pm 114$ vs $X_C: 3.0 \pm 0.1$; ($p < 0.0001$). Los resultados muestran que la actividad FAP y LDH como la presencia de cinc es detectable aun en muestras expuestas a temperaturas elevadas. Los marcadores de plasma seminal evaluados pueden ser utilizados en el laboratorio forense como indicadores de presencia de semen en manchas.

PALABRAS CLAVE: medicina legal, manchas seminales, secreción prostática, fosfatasa ácida prostática, lactato deshidrogenasa, cinc

INTRODUCCIÓN

El estudio del semen en Química Forense está relacionado con el Derecho Penal e involucra delitos de índole sexual, siendo un hecho frecuente en Medicina Legal (1).

El semen está compuesto mayoritariamente por la secreción de las glándulas sexuales anexas y un pequeño porcentaje (2 a 3 %) por espermatozoides. El 46 al 80 % del fluido seminal es aportado por las vesículas seminales, un 13 a 33 % es secretado por la glándula prostática, aproximadamente el 5 % proviene de los testículos y el epidídimo y un 2 a 5 % procede de la secreción de las glándulas uretrales y bulbo uretrales (2). En cuanto a la composición química del semen contiene mayoritariamente ácido cítrico, aminoácidos libres, fructosa, fibrinógeno, enzimas (fosfatasa ácida, fibrinolisisina, lisozima), fosforilcolina, carnitina, alfa glucosidasa neutra, prostaglandinas, potasio y cinc (3).

El elemento fundamental en la identificación del fluido seminal es el hallazgo del espermatozoide, compuesto por cabeza, segmento intercalar o intermedio y cola o flagelo (4).

Entre los componentes químicos del plasma seminal, el cinc secretado por la glándula prostática, se encuentra en concentración cien veces superior al suero sanguíneo reuniendo las características suficientes para ser utilizado como marcador forense de presencia de semen (5).

La FAP es sintetizada por la glándula prostática y secretada en el semen durante la eyaculación. La actividad de FAP está incrementada en el fluido seminal y su determinación es un recurso aplicable a la búsqueda de semen, adquiriendo importancia como marcador forense en casos de muestras azoospermicas (no contienen espermatozoides en el eyaculado) u

oligozoospermicas (concentración espermática menor a 15 millones por mL de semen) (6). Otro marcador de presencia de fluido seminal es la determinación de la enzima LDH cuya actividad en semen es superior al valor del suero y además la isoenzima LDH C4 es específica del epitelio seminal (7). La detección de componentes del fluido seminal es importante, sin embargo el diagnóstico de certeza de la presencia de semen es el hallazgo de al menos un espermatozoide. En el caso de no observar un espermatozoide en las muestras examinadas no excluye la presencia de semen. Dada la elevada frecuencia de muestras forenses clasificadas como presuntivas, es un desafío buscar métodos confiables que permitan corroborar la presencia de fluido seminal siendo un aporte importante en la Química Forense. El hecho de no hallar al menos un espermatozoide en el material proveniente de una violación puede deberse a que el causante del delito es azoospermico, oligozoospermico o puede haber utilizado preservativo (8) (9).

Nuestro objetivo fue evaluar la actividad de FAP y de LDH y los niveles de cinc en telas con manchas de semen incubadas a temperaturas elevadas (56°C) y su aplicación en el Laboratorio Forense.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con muestras de semen provenientes de hombres que consultaron por infertilidad en el Servicio URHMA y cuyas muestras seminales se procesaron en el Laboratorio Mixto de Reproducción del Hospital Centenario de Rosario. Luego de completar los estudios de interés clínicos, con el remanente del plasma seminal se realizaron manchas aplicando 200µl de muestra sobre trozos de lienzo (n=50) y se dejaron secar por simple exposición al aire. Se extrajeron los fragmentos de tela de 0.5 cm de diámetro con sacabocados, se colocaron en tubos Khan y se eluyeron mediante incubación a 56°C en un medio ácido compuesto por ácido sulfúrico y nítrico (1:3) diluido al décimo con agua bidestilada. Luego de incubar durante 1 hora con agitación periódica, se centrifugó y en el sobrenadante se determinó la actividad de FAP y de LDH mediante métodos cinéticos optimizados a 30°C y la concentración de cinc mediante espectrofotometría de absorción atómica (4). Se procesó como control un trozo de lienzo sin semen.

Determinación de FAP

La determinación de la actividad de FAP en los eluidos de las muestras y el control se realizó utilizando un kit comercial con alfa-naftil fosfato como sustrato en buffer citrato a pH 4,9 y L+ tartrato para la inhibición de la isoenzima prostática. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en Espectrofotómetro Wayeers 4001 a 30°C.

Determinación de LDH

Para evaluar actividad LDH en los eluidos de muestras y el control se utilizó un kit comercial cinético UV optimizado de acuerdo a la Sociedad Alemana de Química Clínica (DGKC). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en Espectrofotómetro Wayeers 4001 a 30°C.

Determinación de cinc

En los eluidos de las muestras y el control se determinó la concentración de cinc aplicando espectrofotometría de absorción atómica con espectrofotómetro Metrolab 250 AA, lámpara de cátodo hueco de Zn (L.233-30NQ Hamamatsu Photonics KK) y con una intensidad de corriente de 7 mA. Se seleccionó la longitud de onda de 214,50 nm para realizar las lecturas de absorbancia de las distintas soluciones; la composición de la llama fue aire-acetileno. Las concentraciones de cinc se obtuvieron por extrapolación en una curva de calibración efectuada con testigo de cinc preparado a partir de granallas de cinc en medio ácido clorhídrico.

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba *t* de Student para comparar los promedios de las variables entre ambos grupos. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las tres variables (actividades de FAP y LDH y concentración de cinc) cuantificadas en los eluidos de los lienzos con las manchas de semen (X_M) y en el control de lienzo sin semen (X_C). Figuras 1, 2 y 3 ($p < 0.0001$). Grupo 1: X_M Grupo 2: X_C

Figura 1: Actividad FAP

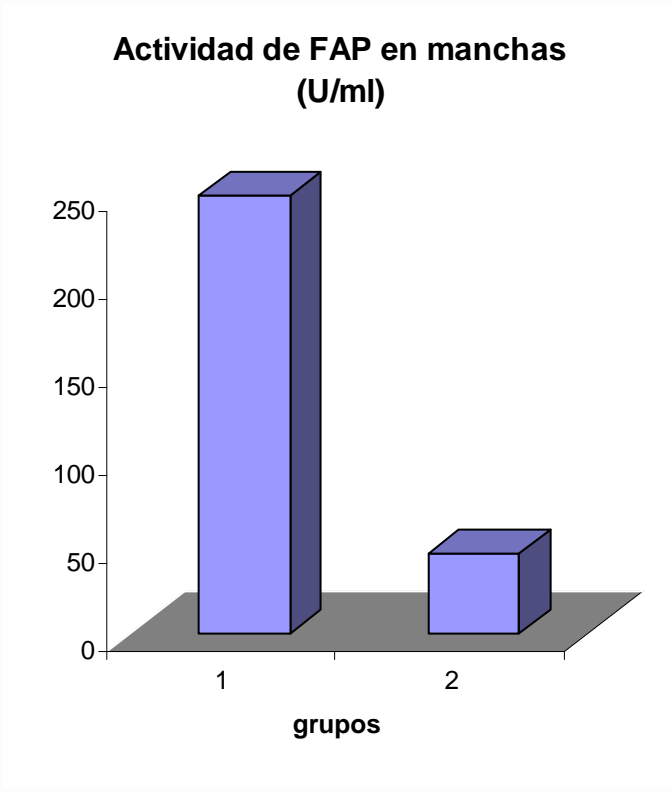
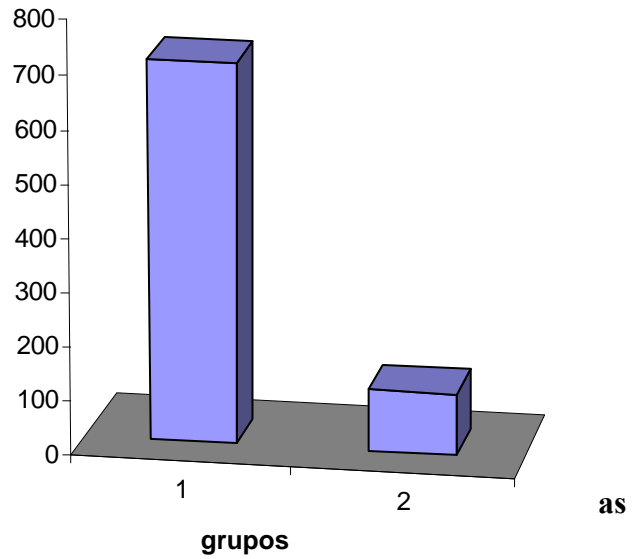
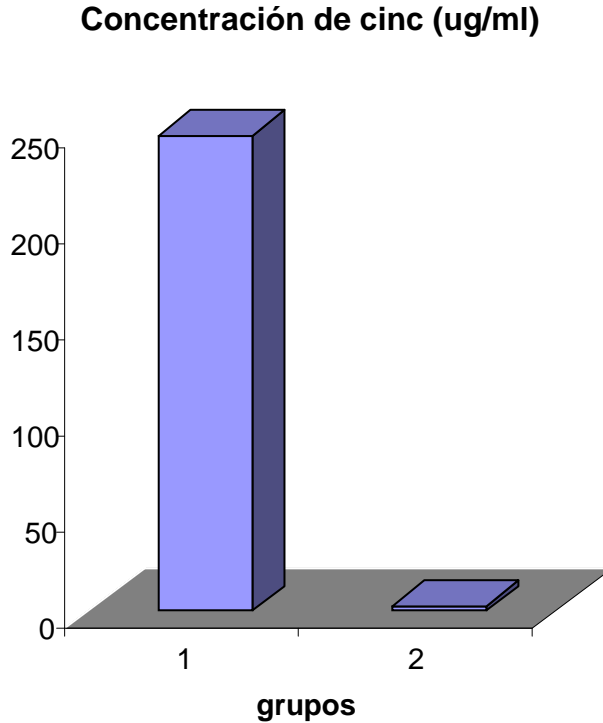


Figura 2: Actividad LDH

Actividad LDH en manchas (U/l)





DISCUSIÓN

Los Laboratorios Criminalísticos cuentan con una demanda creciente de muestras provenientes de delitos sexuales y los recursos disponibles para la justicia no son suficientes en su esclarecimiento. El Laboratorio Forense necesita herramientas científicas para resolver este problema (8).

El semen está constituido por las secreciones provenientes de los testículos, el epidídimo, la glándula prostática, las vesículas seminales, las glándulas de Cowper y de Litreé. Varios autores se abocaron al estudio de los distintos componentes del fluido seminal y su rol como marcadores de presencia de semen en muestras forenses. La mayoría de las investigaciones se focalizaron en la búsqueda de los espermatozoides, seguidos por los marcadores de las glándulas anexas como FAP y cinc que adquieren relevancia en casos de delitos sexuales realizados por sujetos azoospermicos (6) (7) (10).

El estudio de manchas de semen tiene gran importancia en criminalística, ya que constituye una prueba precisa y está asociada a crímenes de índole sexual. El reconocimiento es sencillo en manchas seminales de reciente data, pero se complica al transcurrir el tiempo. Las muestras que debe analizar el bioquímico criminalístico-forense pueden estar sujetas a variaciones climáticas que alteran los marcadores bioquímicos de presencia de semen en el material sujeto a la investigación forense (8).

CONCLUSIONES

El diagnóstico genérico del semen se ha detenido en su evolución debido a la falta de aplicación de técnicas adecuadas y modernas que aporten mayor credibilidad al hallazgo. Contribuir en el esclarecimiento de la problemática planteada es un desafío del Laboratorio Bioquímico Forense. La aplicación de técnicas específicas desarrolladas para identificar marcadores bioquímicos del plasma seminal, por los niveles elevados en que son secretados por las glándulas anexas y en algunos casos como la FAP la especificidad de localización de la secreción pueden ser aplicados en la resolución de la problemática planteada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ccaza-Zapana, J. E. (2013) *La nueva criminalística*. México, 5 (10): 1-11.
2. López-García, M. J., Urbano-Felice, A., y Cárdenas-Povedano, M. *Manual de Laboratorio para análisis del semen*. Omnia Science. Omnia Publisher S.L. 2012. Pp. 2-10.
3. Carma, I. (2010) *Métodos de Reconocimiento. Identificación e Individualización de manchas de semen*. España.
4. World Health Organization WHO 2010. *Laboratory manual for the examination and processing of human sperm 5th ed.* Cambridge University Press. Cambridge.
5. Pavesi, A, Servidio, A., Paparella, C., Girolami, H., y Bouvet B. (2010). Valoración de cinc en manchas seminales y su aplicación en la práctica forense. *Revista Ciencia UAT*. 15(2): 1-7.
6. Pavesi, A., Paparella, C., Bouvet, B., and Pituelli N. (2008). Prostatic acid phosphatase activity in basal seminal plasma and post exposition to high temperature. *Biocell*. 32 (3): 29.

7. Pavesi, A., Paparella, C., and Bouvet B. (2011). Lactate Deshidrogenase: Activity in human seminal plasma. *Biocell*. 35 (2): 179.
8. Támara, K. L. (2013). *Identificación de manchas de semen en diferentes soportes de interés forense*. 1° Edición Digital. Pp. 1-18. Lima. Perú.
9. Turvey, B. F. (2014) Forensic Victimology Examining Violent Crime. *Victims in investigative and Legal Context*. (Pp. 517-546). Reino Unido. Elseiver.
10. Quispe-Mayta1, S., Tarifa-Espinoza, S., Solís-Pacheco, R., and Sierra-Gareca, A. (2010) Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense. *BIOFARBO*. 18(2): 91–99.