

VALORACIÓN DE CINCO EN MANCHAS SEMINALES Y SU APLICACIÓN EN LA PRÁCTICA FORENSE

Beatriz Bouvet, Bioquímica-Especialista en endocrinología; Héctor Girolami, Bioquímico-Especialista en endocrinología; Analía Servidio, Técnica de laboratorio; Cecilia Paparella, Bioquímica-Profesora universitaria de Química; Adriana Pavesi, Bioquímica-Perito en criminalística*.

* Autora responsable: apavesi2001@yahoo.com.ar

RESUMEN

El estudio de semen en medicina legal es un hecho frecuente por lo que adquiere importancia en problemas vinculados al Derecho Penal. El cinc (Zn) se encuentra en altas concentraciones en el fluido prostático. La determinación de cinc en manchas es una prueba que puede utilizarse como indicador de la presencia seminal aún en ausencia de espermatozoides.

El objetivo de este trabajo es evaluar los niveles de Zn en manchas seminales y su aplicación en la práctica forense. Para ello se prepararon 33 manchas de semen colocando 0.2 ml de plasma seminal sobre un lienzo, secado a temperatura ambiente. Se cortaron áreas de 0.7854 cm² de tela manchada y 33 áreas de tela sin manchar. Se realizó mineralización de la materia orgánica llevando a un volumen final de 10 ml

determinándose Zn por espectrofotometría de absorción atómica. Todo el material utilizado se descontaminó con ácido nítrico al 10%. Se calculó la concentración de Zn por cm² para ambos grupos de muestras, el promedio para las telas con manchas de semen fue de 23.47 ug/cm² con un desvío estándar de 9.09 y el de las telas sin las manchas fue de 3.00 ug/cm² con un desvío estándar de 0.10. Se aplicó la prueba *t student* para comparar los promedios entre ambos grupos y las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,006$). Las determinaciones de Zn en manchas seminales se pueden aplicar en la investigación de casos de abusos sexuales realizados por sujetos azoospermicos u oligozoospermicos. Su cuantificación en manchas sospechosas puede considerarse como un ensayo de exclusión de plasma seminal.

PALABRAS CLAVE: Cinc, manchas seminales, Criminalística, Medicina Legal, espectrofotometría de absorción atómica.

ABSTRACT

The study of semen in legal medicine is a frequent fact that is why it takes importance in problems related to Criminal Law. Zinc (ZN) is found in prosthetic fluid in high concentration. The determination of Zinc in stains is proof that it can be utilized as the indicator of a seminal presence even in the absence of sperm.

The objective of this work is to evaluate the levels of Zinc in seminal stains and its application in forensic practice. For this study 33 stains were analyzed, placing 0.2ml of seminal plasma over a dry canvas. Cuts were made on 0.7854cm² areas of stained cloth and 33 areas of the non stained cloths.

There was also the mineralization of the matter to a final volume of 10ml determining Zinc by spectrophotometry of atomic absorption. All the material used was decontaminated with nitric acid to the 10%. The Zinc concentration was calculated by cm^2 (square centimeters) for both groups of samples, the average for the stained cloths remained a 23.47 ug/cm^2 with a slight standard deviation of 0.09 and in the non stained cloths the average was 3.00 ug/cm^2 with a standard deviation of 0.10. The student test was applied to compare the averages between both groups and the differences where statistically big ($p=0.006$). Zinc determinations in seminal stains can be applied in sexually related crimes portrayed by azoospermic or oligozoospermic objects. Their quantification in suspect stains can be considered for the exclusion of seminal plasma.

KEYWORDS: Zinc, seminal stains, Criminalistics, legal Medicine, atomic absorption spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

El estudio del semen en medicina legal es un hecho frecuente, por lo que su investigación y diagnóstico adquieren gran importancia en problemas vinculados al Derecho Penal, por lo cual no sólo resulta útil para el bioquímico y el médico forense, sino también para los jueces, fiscales e instructores policiales.

El líquido espermático se presenta al investigador en distintas formas (Gisbert-Calabuig, 1998):

- 1) Como mancha impregnado en un tejido.
- 2) Como fluido mezclado con otros líquidos corporales.
- 3) Como semen.

El esperma consta de dos elementos

diferentes: Las células de descamación epitelial y espermatozoides provenientes del testículo y el plasma seminal proveniente del epidídimo, la glándula prostática, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper y de Litree.

Las glándulas accesorias producen grandes cantidades de sustancias como prostaglandinas (200 ug/ml [microgramos/mililitros]), espermina (3.0 ug/ml), fructosa (2 ug/ml), ácido cítrico (4.0 ug/ml), proteínas (40 mg/ml [miligramos/mililitros]) y altas concentraciones de cinc (Zn) (150 ug/ml). Además inmunoglobulinas y enzimas específicas como proteasas, esterasas y fosfatasa (Sans, et al., 1969; Manual de criminalística; Zjaczkowski, 1998).

Cuando nos encontramos frente a una mancha, ésta puede ser visible y como tal, se presenta de forma almidonada. La morfología de las manchas es irregular, con unos contornos bien delimitados. No obstante, puede haber interferencias según el mecanismo de producción: si se debe a una eyaculación se produce una gran zona manchada con aspecto típico. Si la mancha se halla depositada en un sector expuesto al roce con objetos extraños, perderá su tersura, y si además se encuentra contaminada con otros fluidos o secreciones, hecho frecuente en criminalística, se dificulta la observación a simple vista (Zjaczkowski, 1998). Las prendas sospechosas deben ser examinadas a la luz ultravioleta (UV) de Wood. Las manchas de esperma dan fluorescencia de color blanco amarillento, que se va tornando amarillo con el tiempo. El examen con luz UV. permite diferenciarlas de otros productos como la orina (fluorescencia celeste), el pus, el moco o la secreción vaginal. Sin embargo los resultados de la luz UV no son específicos del semen.

No debe olvidarse que ciertas telas poseen fluorescencia, lo que se llama fluorescencia de base y en este caso sobre un fondo fluorescente se advierte una zona sin fluorescencia que sería la sospechosa para el estudio (Manual de criminalística). Además, la fluorescencia puede estar ausente si la mancha ha sido tratada con detergente (Gisbert-Calabuig, 1998; Manual de criminalística). Los métodos más frecuentes utilizados para identificar la presencia de semen se centran en la detección de espermatozoides (Manual de criminalística; García y Gómez, 1995; Zjaczkowski, 1998). El hallazgo de uno de ellos morfológicamente completo es considerado un diagnóstico de certeza (Manual de criminalística; Zjaczkowski, 1998; Vega-Somonte y Ferrer-Marrero, 2005).

Sin embargo, el hecho de no encontrar un espermatozoide completo no es excluyente de pensar que la mancha problema es de semen. La no detección de células espermáticas puede atribuirse a varias razones:

La deshidratación de los espermatozoides en la mancha que los hace frágiles, alterando sus membranas, destruyéndolos o separando las cabezas espermáticas.

Los espermatozoides se adhieren fuertemente al tejido, dificultando su recuperación.

La distribución de la mancha no es uniforme por lo cual puede analizarse una alícuota en donde no se encuentren espermatozoides.

Por otro lado, hay que tener presente la posibilidad de estar ante sujetos sospechosos azoospermicos u oligozoospermicos (Gisbert-Calabuig, 1998; Sarmiento y Morris, 2003).

También se puede determinar la actividad de la fosfatasa ácida prostáti-

ca, utilizando inhibidores específicos, dado que no se registran interferencias significativas con otros fluidos biológicos y la convierte en buen marcador de plasma seminal (Pavesi et al., 2007). La exposición ambiental a altas temperaturas no resulta crítica para su detección, por lo que se aplica en casos de abusos sexuales que transcurren en espacios abiertos (Pavesi et al., 2007).

Existen métodos que incluyen la determinación de espermina y colina mediante ensayos microcristalográficos a los que se les asigna el valor de ensayos de orientación (Manual de criminalística; García y Gómez, 1995; Sarmiento y Morris, 2003).

Se admite que la espermina se origina primitivamente en la próstata porque el fluido prostático contiene 10 veces más espermina que el proveniente de los testículos (Manual de criminalística).

Los métodos cromatográficos y electroforéticos que se han propuesto como adecuados para identificar manchas seminales, están basados en la separación e identificación de una o más sustancias de bajo peso molecular que se encuentran en semen en altas concentraciones tales como: colina, espermina y espermidina (Manual de criminalística; Reiman y Prokop, 1987; Schaeffer et al., 1990; Abrams, 1998).

El Zn se encuentra en altas concentraciones en fluido prostático, por lo tanto, la detección de Zn en manchas seminales sería un buen indicador de la presencia de semen (Jhonsen y Eliason, 1987). Un método analítico de dosificación de Zn en manchas de semen en telas podría ser aplicado con fiabilidad en la identificación en manchas seminales presentes en ropas de vestir de individuos víctimas de violación (García y Gómez, 1995).

Para evitar el problema de sujetos azoospermicos o vasectomizados, es conveniente que el marcador sea un componente del plasma seminal (García y Gómez, 1995; Sarmiento y Morris, 2003); el Zn cumple con este requisito, ya que se encuentra en plasma seminal y en mayor concentración en semen que en otros fluidos biológicos (Sarmiento y Morris, 2003). El Zn se encuentra presente en todos los tejidos y fluidos corporales. El músculo esquelético y el hueso contienen el 90% del total, siendo también alta su concentración en los coroides del ojo, en la piel, el cabello y en la próstata, mientras que en el plasma sanguíneo se encuentra sólo del 0.1% al 0.5% lo que permite afirmar que es un catión intracelular (Cousins y Hempe, 1991; WHO, 1996; Shrimpton, 1994).

Al ingerir los alimentos y digerirlos se libera Zn a la luz intestinal y es incorporado al interior de la célula, allí se une a la metalotioneína y otras proteínas ricas en cisteína, pasando luego a la circulación (Sturniolo, 1991).

Se absorbe entre un 20% al 40% de la ingesta de los alimentos, ésta es menor cuando son vegetales, frutas o cereales por la presencia de fitatos y oxalatos que se unen al Zn, disminuyendo la cantidad disponible a ser absorbida (Lonnerdal, 2000).

En la sangre es transportado unido a la albúmina en un 70% y un 20% por la Δ_2 macroglobulina. El total del Zn en la circulación es del 0.1% del total del cuerpo, es decir, la sangre es sólo un medio de transporte para llegar a las células de almacenamiento. La excreción se hace principalmente a nivel de las heces y en menor cantidad en la orina. La excreción urinaria varía entre 0.4 mg y 0.6 mg diarios (Santini, 2002).

Las concentraciones más altas de

Zn están en la secreción de la glándula prostática, en eritrocitos y leucocitos de la sangre. La concentración en plasma sanguíneo es de 70 ug/dl (microgramos/mililitros) a 150ug/dl (Santini, 2002); la sangre total contiene mayor concentración de Zn que el plasma sanguíneo debido a la presencia de la enzima eritrocitaria anhidrasa carbónica, que contiene Zn como grupo prostético.

La concentración promedio en semen es de 150 ug/ml (Bouvet, 2003), más de 100 veces la concentración sanguínea. El Zn es un componente de plasma seminal y dado su elevada concentración, reúne las condiciones requeridas para la identificación de manchas en la práctica forense.

OBJETIVO

Evaluar los niveles de Zn en manchas seminales y su aplicación en la práctica forense.

MATERIAL Y MÉTODOS

A) Preparación de las muestras: Se trabajó con 33 muestras de semen provenientes de pacientes del Servicio de Reproducción y Urología del Hospital Provincial del Centenario de Rosario, Argentina. Después del estudio clínico completo del semen, con los remanentes de los plasmas seminales se realizaron las manchas. Se aplicaron 200 ul de plasma seminal sobre trozos de lienzo y se dejaron secar por simple exposición al aire. Con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro se cortaron áreas de 0.7854 cm² (centímetros cuadrados) obteniéndose dos grupos de muestras:

M1 (n=33): Lienzo + semen

M2 (n=33): Lienzo (blanco)

Una vez obtenidos los círculos, éstos se colocaron en tubos de centrifuga

CONCENTRACIÓN DE CINC EN EL LIENZO

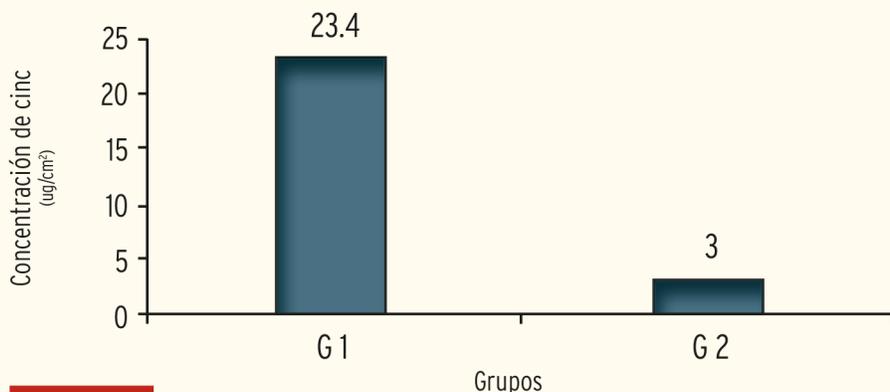


FIGURA 1

Concentración de cinc en el lienzo .

G1: tela con la mancha G2: tela sin la mancha

a los que se les agregó 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.6 ml de ácido nítrico concentrado, calentándolos posteriormente a 60° C (García y Gómez, 1995) durante seis horas con agitación periódica. Una vez lograda la disolución de la muestra, se trasvasó el contenido a un tubo de ensayo graduado, llevando a un volumen final de 10 ml con agua destilada.

B) Determinación del Zn: Todo el material utilizado para preparar los testigos y las muestras, se lavó con ácido nítrico diluido al 10% y se enjuagó al menos 10 veces con agua destilada. Con granallas de Zn, se preparó una solución patrón con una concentración de Zn de 1 mg/ml. Posteriormente, mediante diluciones con agua destilada se realizó la curva de calibración con las siguientes concentraciones de Zn: 0.0 ug/ml, 0.1 ug/ml, 0.2 ug/ml, 0.5 ug/ml, 1.0 ug/ml y 2.0 ug/ml, y se procesaron en iguales condiciones que las muestras provenientes de las manchas de semen. Las muestras diluidas de los testigos y los desconocidos (manchas) fueron

atomizadas en la llama en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Metrolab modelo 250AA registrándose los respectivos valores de absorbancia.

Condiciones de trabajo en la determinación del Zn:

Se utilizó una lámpara de cátodo hueco de Zn: L.233-30NQ marca Hamamatsu Photonics KK (L233), 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 es aire-acetileno.

La curva de calibración presentó linealidad hasta la concentración de 2.0 ug/ml de Zn. Siempre que se procesaron muestras preparadas a partir de las manchas, se realizó la curva de calibración con las seis concentraciones mencionadas con el fin de mantener las condiciones y la geometría del ensayo.

El contenido de Zn de las muestras (manchas) se obtuvo aplicando las siguientes fórmulas (García y Gómez, 1995):

$$C_1: (1/a) \cdot V \cdot C_s$$

$C_2: (1/a) \cdot V \cdot C_c$ siendo

a: área

V: volumen final

C_s : Concentración en ug/ml

C_c : Concentración de Zn luego la corrección con el blanco.

RESULTADOS

El promedio de la concentración de Zn de las respectivas manchas realizadas con las 33 muestras de semen fue de 23.47 ug/cm² con un desvío estándar de 9.09 ug/cm², mientras que el promedio de la concentración de Zn en la tela sin mancha fue de 3.00 ug/cm² con un desvío estándar de 0.10 ug/cm².

Se aplicó la prueba t *student* para el análisis estadístico. La comparación de los promedios de la concentración de Zn por área entre las telas con semen y las telas sin semen mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,006$). Siempre se debe procesar un blanco de la tela o el material donde el agente causante de la mancha esté ausente.

Las concentraciones de Zn halladas en el grupo (G1) que corresponde a la elusión de las manchas depositadas en el lienzo, demuestran que el líquido seminal es capaz de producir resultados que se pueden identificar mediante el procedimiento analítico utilizado para determinar Zn en muestras de semen (Figura 1).

DISCUSIÓN

La Química Legal analiza sobre la base de procedimientos científicos y los problemas planteados por la justicia, investigando los elementos relacionados con un hecho delictivo. Los resultados obtenidos en el laboratorio bioquímico podrán modificar o consolidar la investigación en un rumbo determinado, destacando la prueba pericial como

aporte al esclarecimiento de los hechos (Zjaczkowski, 1998).

La identificación del semen como componente de una mancha problema, constituye una constante preocupación en los laboratorios criminalísticos o forenses (Sarmiento y Morris, 2003), debido a que en los últimos años se han incrementado las causas vinculadas a delitos sexuales relacionados con casos de violación. Por ser conocido el delito de violación doctrinalmente como un hecho de soledad, en donde sólo se cuenta con las declaraciones de la víctima y el victimario, y sabiendo que siempre la investigación criminalística apunta a la búsqueda de un nexo entre la víctima y el sospechoso, es que adquiere destacada importancia la información que pueden brindar las pruebas periciales a la investigación (Sarmiento y Morris, 2003).

En los casos de consumación del delito sin testigos o casos seguidos de homicidio, las pruebas materiales adquieran un significado excepcional.

La presencia de semen en la vagina, en la vestimenta u otra parte del cuerpo de la víctima, o material recolectado del lugar del hecho, brinda información valiosa que puede emplearse en la investigación, ayudando tanto a la calificación del delito, como al establecimiento del grado de participación de los autores (Manual de criminalística; Zjaczkowski, 1998).

CONCLUSIONES

La determinación analítica de Zn a partir de una supuesta mancha seminal nos permite identificar este fluido biológico mediante la cuantificación de este componente. El Zn por su concentración elevada en el semen, adquiere gran importancia legal y puede utilizarse para investigar la presencia de fluido seminal en una prenda sospechosa.

La metodología aplicada en este estudio es apropiada para la búsqueda de semen en manchas provenientes de individuos azoospermicos u oligozoospermicos en donde es difícil encontrar espermatozoides.

Como se mencionó anteriormente, la concentración de Zn en el semen es 100 veces superior a la de la sangre y otros fluidos biológicos considerados

como posibles materiales contaminantes y es un dato relevante ya que permite descartar sus posibles interferencias.

Consideramos que la determinación de Zn en manchas es una prueba que puede utilizarse como un indicador de la presencia seminal, dado que cumple con las condiciones de marcador criminalístico y posee elevada aplicabilidad en medicina legal. ||

Referencias Bibliográficas

- Abrams, P., Blaivas, J., Stantons, S. y Andersen, J. (1988). "Standardization of terminology of lower urinary tract function", en *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 114 Supl.: 5-19.
- Bouvet, B., Gatti, W. y Girolami, H. (1993). "Evaluation de Zinc en plasma seminal humano", en *V Boletín Informativo Colegio de Bioquímicos de la 2da. Circunscripción de la Provincia de Santa Fe*. 57: 10.
- Cousins, R.J. y Hempe, J.M. (1991). *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6ª ed. Washington: ILSI PRESS.
- García y Gómez, F.A. (1995). *Estudio experimental de la determinación de Zinc en manchas de semen y su aplicación médico legal*. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Gisbert-Calabuig, J.A. (1998). *Medicina legal y toxicología*. 5ª ed. Madrid: Masson.
- Johnsen, O. y Eliason, R. (1987). "Evaluation of commercially available kit for the colorimetric determination in human seminal plasma", en *International Journal of Andrology*. 10(2): 435-440.
- Lonnerdal, B. (2000). "Dietary factors influencing Zinc absorption", en *Journal of Nutrition*. 130: 1432-1436.
- *Manual de criminalística de la Policía Federal Argentina*. Editorial Policial. Código: 12044014.
- Pavesi, A., Bouvet, B., Paparella, C. y Pitueli, N. (2007). "Actividad de fosfatasa ácida prostática en plasma seminal basal y expuesto a altas temperaturas", en *IX congreso y XXVII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario*.
- Reiman, W. y Prokop, O. (1987). *Vademécum de Medicina Legal*.
- Sans, E., Avila, L.M., Gaiden, P., Escobar, M. y Santos A.M. (1969). *Investigación Clínica, Tomo 1*. 48(3): 174.
- Santini, M. (2002). "Zinc su uso parenteral", en *Bioteconómica. Folleto Zn Gen*.
- Sarmiento, R. y Morris, H.J. (2005). "Marcadores para el diagnóstico genérico en la investigación criminalística de semen. Reseña analítica", en *Revista cubana de química*. 15(1): 55-62.
- Schaeffer, A., Liang, J., Liu, Y., Zou, J., Franklin, R. y Costello, L. "Diagnosis and treatment of prostatic infections", en *Urology*. 36 Supl.(13): 2-13.
- Shrimpton, R. (1994). "Zinc deficiency: is a widespread but under recognized?", en *SCN News*. 9: 24-27.
- Sturmiolo, G.C. et al., (1991). "Inhibition of gastric acid. Secretion reduces zinc absorption in man", en *Journal American College of Nutrition*. 10: 372-375.
- Vega-Somonte, L.M y Ferrer-Marrero, D. (2005). "Alternativas para la tinción de diagnóstico citológico vaginal del espermatozoide, estudio en el IML de La Habana", en *VII Congreso Virtual Hispanoamericano y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet*. 1 al 31 de octubre de 2005.
- World Health Organization. WHO. (1996). "Zinc", en *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva: WHO.
- Zjaczkowski, R.E. (1998). *Manual de criminalística*. Ed Ciudad Argentina.