



Investigación forense del Antígeno Específico de Próstata (PSA) en delitos de agresión sexual, en diversos fluidos biológicos humanos de interés forense

QUISPE MAYTA, SERGIO E.¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 13 DE MAYO DE 2015

FECHA DE ACEPTACIÓN: 17 DE JUNIO DE 2015

Resumen

Se ha cuantificado la presencia de Antígeno Específico de Próstata (PSA) en el fluido seminal. El PSA es una proteína seminal bastante estudiada, se ha realizado la determinación de la presencia detectable mediante el método de Inmunoensayo ELISA en diversas muestras de interés forense como: fluidos biológicos de varones: sangre, orina, saliva, heces. Fluidos de mujeres: sangre menstrual, orina, hisopado vaginales y anales. Muestras mezcladas de sangre venosa y menstrual con semen diluido. En los fluidos que provienen de mujeres no se observa valores detectables de PSA, en cambio en los fluidos biológicos de varones como semen, sangre, orina, se detectó concentraciones apreciables de PSA. En la investigación de delitos sexuales la prueba de PSA por ELISA tiene una gran importancia en el diagnóstico en la investigación Criminalística del semen, asimismo cuando exista la presencia de varios fluidos biológicos sobre un indicio debe

Abstract

The presence of Specific Antigen of Prostate (PSA) has been quantified in the seminal fluid. PSA is a seminal protein enough studied, the mediating presence the method of Inmunoensayo ELISA has been determined in diverse samples of forensic interest: males' biological fluids: blood, urine, saliva, feces. Women's fluids: blood menstrual, urine, vaginal fluid and anal sample. Mixed fluids of blood and menstrual blood with diluted semen. In the fluids that come from women it is not observed values detectables of PSA, on the other hand in the biological fluids of males as semen, blood, urinates, it was detected appreciable concentrations of PSA. In the investigation of sexual crimes the test of PSA for ELISA has a great importance in the search and investigation in Forensic Biochemistry of the semen, when the presence of biological several fluids exists on an indication it should be

¹ Encargado Unidad de Identificación Genética UNIGEN, Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.

interpretarse con mucha cautela los valores hallados por el laboratorio forense.

interpreted with a lot of caution the values found by the forensic laboratory.

PALABRAS CLAVE

Antígeno Prostático Específico, PSA, violación, sangre menstrual.

KEY WORDS

Antigen Specific Prostático, PSA, sexual aggression, bleed menstrual.

INTRODUCCIÓN

La evaluación forense de la evidencia biológica, adquiere vital importancia en la rápida detección por el laboratorio forense en la pesquisa de espermatozoides y liquido seminal en muestras vaginales de victimas de agresión sexual. La detección del espermatozoide se realiza mediante la examinación microscópica, que esta definida como una prueba Gold Standard. La investigación del plasma seminal se realiza mediante la detección de componentes bioquímicos del semen, como la enzima fosfatasa ácida prostática y el Antígeno Específico de Próstata (PSA). El plasma seminal contiene proteínas específicas de interés forense. Esta especificidad permitió utilizar la proteína llamada p30 o PSA de 30.000 Dalton de peso molecular, como un marcador específico de semen, según estudios por Li y Beling. Investigaciones de Sensabaugh y Hochmeister evaluaron diferentes fluidos biológicos humanos mediante la búsqueda de p30, donde se indica que no se encontró en niveles detectables en el suero sanguíneo, lagrimas, saliva, sudor, fluidos genitales femeninos como sangre menstrual, orina y secreciones vaginales. Se observó que no existe reactividad del PSA con otros fluidos como contenido gástrico, semen de otras especies animales, agentes químicos como café, cremas, detergentes, etc.

El Antígeno Específico de Próstata (PSA) es una glicoproteína, producida por células de la glándula prostática en el varón, su rol fisiológico esta dirigido en la liofación del coagulo seminal para el proceso de la fecundación, ha sido bastante caracterizada y validada por la comunidad Científica Forense, como un marcador específico de la presencia de fluido seminal (Hochmeister 1999; Johnson 1993; Poyntz 1984; Sensabaugh 1978). Localizada en la región 13q del cromosoma 19.

En el presente trabajo, mediante el método Inmunoensayo ELISA (Prueba de PSA, Línea DIALAB), se realizó un análisis rápido, confiable, y altamente sensible para determinar la presencia del PSA en diversos fluidos biológicos de varones y mujeres de interés forense.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado la determinación de la presencia de PSA en diferentes muestras de fluidos biológicos humanos, mediante el Método Inmunoenzimático ELISA.

Controles positivos: Se utilizó controles estándar de PSA de concentración conocida (0.5; 1.56; 3.1; 6.25; 12.5 y 25.0 ng/mL)

Controles negativos: Se utilizó agua bidestilada con la cual se realizo las extracciones de las muestras.

Muestras de referencia colectadas a diez varones sanos en edad reproductiva (18 a 35 años): Se han colectado a diez varones muestras de sangre venosa, semen, orina, saliva, e hisopados anales. Con las muestras de sangre, semen, orina y saliva, se realizó un pool para obtener un valor promedio. De estos preparados se empaparon aproximadamente un volumen de 150 uL en hisopos estériles de cada fluido biológico, se dejó secar y se procedió a cortar una tercera parte del hisopo para la extracción de la muestra. Las muestras de hisopado anal fueron procesadas de manera individual.

Muestras de referencia colectadas de diez mujeres: Sangre venosa, sangre menstrual, orina, saliva, hisopados vaginales e hisopados anales, correspondientes a mujeres que no tuvieron contacto íntimo con un varón hasta las 96 horas anterior a la toma de muestra.

Según el tipo de fluido biológico: las muestras de sangre venosa, orina, saliva se realizaron mezclas y posteriormente evaluadas de manera individual. Las muestras de sangre menstrual, hisopeado vaginal e hisopados anales fueron analizadas individualmente.

Foto 1. Fotografía del Kit utilizado para las determinaciones de PSA



Foto 2. Fotografía de láminas con frotis de muestras vaginales para la detección de PSA. a) lamina con muestra de hisopado vaginal b) lamina con muestra de hisopado vaginal con sangre.



Foto 3. Fotografía de toma de muestras de saliva en casos de sugilación



Muestras de sangre menstrual y semen diluido (1:200.000). Se procedió a mezclar un volumen de 100 uL de sangre menstrual con un volumen igual de semen diluido hasta 200.000 veces.

Determinación del Antígeno Específico de Próstata (PSA). Mediante la prueba de PSA de la línea comercial DIALAB (Austria), se trabajó con los estándares de concentración de PSA: 1.56; 3.1; 6.25; 12.5 y 25.0 ng/mL de PSA, controles positivo y negativo. Se ha seguido el protocolo descrito. 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.

RESULTADOS

PSA en muestras de varones:

- Las muestras de varón, correspondientes a sangre, semen, orina e hisopado anal, dieron resultado Positivo para PSA. (Tabla 1)
- Las muestras de saliva dieron resultado Negativo para PSA, para una concentración de 0.2ng/mL de PSA. (Tabla 1)

Tabla 1. Muestras analizadas correspondientes a varones en edad reproductiva:

Nº	MUESTRAS	ABSORVANCIA	CONCENTRACIÓN DE PSA	RESULTADO
1	CONTROL NEGATIVO	0.055	AUSENTE	NEGATIVO
2	CONTROL POSITIVO (0.2ng/mL PSA)	0.72	0.2 ng/mL	POSITIVO
3	SANGRE VENOSA	0.134	1.52 ng/mL	POSITIVO

4	SALIVA	0.070	AUSENTE	NEGATIVO
5	ORINA	0,358	6.25 ng/mL	POSITIVO
6	HISOPADO ANAL	0.125	1.45 ng/mL	POSITIVO

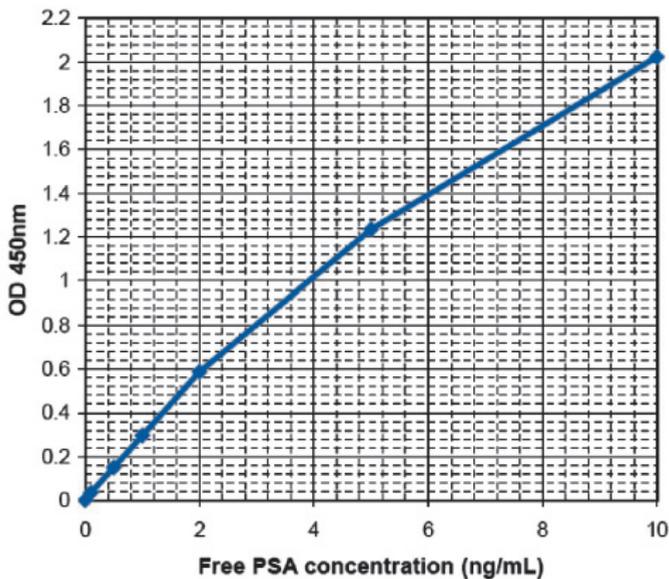
PSA en muestras de mujeres:

- Las muestras procedentes de mujeres: sangre venosa, sangre menstrual, hisopado vaginal, orina e hisopado anal, dieron resultado Negativo para PSA. (Tabla 2)
- Las muestras mezcladas de sangre menstrual y sangre venosa con semen diluido (1:200.000), dieron resultado Positivo para PSA. (Tabla 3)

Tabla 2. Muestras analizadas correspondientes a mujeres en edad reproductiva:

Nº	MUESTRAS	ABSORVANCIA	CONCENTRACIÓN DE PSA	RESULTADO
1	CONTROL NEGATIVO	0.055	AUSENTE	NEGATIVO
2	CONTROL POSITIVO (0.2ng/mL PSA)	0.72	0.2 ng/mL	POSITIVO
3	SANGRE	0.070	AUSENTE	NEGATIVO
4	SALIVA	0.056	AUSENTE	NEGATIVO
5	ORINA	0.071	AUSENTE	NEGATIVO
6	HISOPADO ANAL	0.068	AUSENTE	NEGATIVO
7	HISOPADO VAGINAL	0.060	AUSENTE	NEGATIVO
8	SANGRE MENTRUAL	0.070	AUSENTE	NEGATIVO
9	SANGRE VENOSA Y SEMEN DILUIDO Dilución 1:200.000	0.212	3.12 ng/mL	POSITIVO
10	SANGRE MENSTRUAL Y SEMEN DILUIDO Dilución 1:200.000	0.220	3.20 ng/mL	POSITIVO

Foto 3. Gráfico de lectura: absorbancia y concentración de 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. Mediante la detección de espermatozoides y de PSA por prueba de ELISA pueden ser empleados como pruebas confirmatorias en la detección de semen. El PSA como proteína se comporta de manera estable en las manchas 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.

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. 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 la determinación de PSA sobre fluidos como sangre venosa, muestras de orina, hisopados anales de varón, se ha observado valores detectables de PSA hasta 0.358 Absorbancia en la muestra de orina lo cual significa una concentración de 6.25 ng/mL de PSA, lo cual en casos de violación de varón a varón debe tenerse muy en cuenta a las interpretaciones de estos valores. Asimismo cuando exista la probabilidad de mezcla de fluidos del agresor y la víctima en casos de Violación, debe tomarse en cuenta los valores observados en la sangre y orina de varón.

En el caso de muestras de mujeres en etapa reproductiva, se observó que no se detectó valores significativos o mayores a 0.2ng/mL de PSA en muestras de sangre venosa, sangre menstrual, saliva, orina, hisopados anales e hisopados vaginales.

Cuando se mezcló la sangre menstrual y sangre venosa con muestra diluida de semen se detecta valores estimables o iguales a 3.12 ng/mL de PSA, lo cual corrobora que la muestra de semen aun diluida hasta 200.000 veces y mezclada con sangre menstrual o sangre venosa no interfiere en la detección de PSA por el método de ELISA.

CONCLUSIONES

La detección de espermatozoides y fluido seminal en muestras vaginales de víctimas de agresión sexual es muy importante para brindar como un indicio o prueba de valor legal.

La identificación del Antígeno Específico de Próstata mediante método Inmunoenzimático ELISA, en diversos fluidos biológicos humanos de interés forense es una prueba altamente sensible y específica para la determinación de la presencia de semen.

Los fluidos biológicos de varón como la sangre, orina, heces fecales pueden contener valores significativos de concentración detectable de PSA.

En el caso de los fluidos que proviene de mujeres como sangre venosa, sangre menstrual, orina, saliva, hisopados anales no se detectan valores apreciables de PSA.

Muestras diluidas de semen o mezcladas con sangre venosa o sangre menstrual no interfirieron en la detección de PSA.

REFERENCIAS

- 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
- 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
- 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
- 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
- Carson, F. L., *Histotechnology: A Self-Instruction Text.* American Society of Clinical Pathology. 1990; pp. 214-215.
- The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators, Green, F.J., Ed., Aldrich Chemical Co., p. 532. Milwaukee, WI: 1990
- M. Hochmeister, O. Rudin, U. V. Borer, A. Kratzer, Ch. Gehrig and R. Dirnhofer. Evaluation of Prostate-specific Antigen (PSA) Membrane Tests for the Forensic Identification of semen. Switzerland.