

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Importancia del antígeno prostático en violaciones cuando hay
azoospermia**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
BERNARDO MARTÍNEZ MIGUEL

DIRECTORA: CARINA GUTIÉRREZ IGLESIAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

- ♠ *Le dedico este trabajo a mis padres que me han apoyado a lo largo de mi carrera y de toda mi vida, que con sus consejos, sus regaños y su ejemplo, permitieron que concluyera con este objetivo. Por ello les agradezco y se que continuarán a mi lado para mis próximas metas.*
- ♠ *A mis hermanos; Eduardo, Yovani, Juvencio y Araceli, que son una parte muy importante de la meta que hoy consigo, gracias por estar conmigo y apoyarme incondicionalmente.*
- ♠ *A mis abuelos Evaristo y Mauricia, gracias por su amor y todo el apoyo que me han dado, para ustedes es este trabajo.*
- ♠ *A la memoria de mi abuelo Eleazar que aunque ya no esta conmigo físicamente, nunca me abandonará su recuerdo.*

AGRADECIMIENTOS.

- φ *A los sinodales; QFB Carina Gutiérrez Iglesias, QFB Lilia Tequianes Bravo, QFB Enrique Escalera Zúñiga, QFB José Oscar González Moreno y la MTRA. Leonor Aguilar Santelises.*
- φ *A los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por compartir su conocimiento a lo largo de la carrera, en especial a los profesores: Oscar González Moreno, Cuauhtemoc Sánchez Alvarado y Patricia Vidal Millán.*
- φ *A mis amigos; Nancy, David, Gustavo, Karina, René, Ibett, Alan, Genaro, Poli, Otto, Paco, Oscar, Carlos, Uriel, Iván, Verónica, Guadalupe, Cuauhtemoc, Luis, Araceli, Jazmín y todos los que me faltaron por mencionar.*
- φ *A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, gracias por permitir ser parte de esta Institución.*

ÍNDICE

Lista de tablas	I
Lista de figuras	II
Resumen	IV
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Anatomía del aparato reproductor masculino.....	2
2.2 Mecanismos de la erección, eyaculación y detumescencia.....	4
2.3 Líquido seminal.....	6
2.4 Antígeno prostático.....	9
2.5 Antecedentes históricos.....	12
2.6 Obtención de muestras.....	13
2.7 Manejo de muestras.....	14
2.8 Estudio Médico Forense.....	16
2.8.1 Detección de huellas de semen.....	16
2.9.1.1 Lámpara de Wood.....	16
2.9.1.2 Fosfatasa ácida.....	16
2.8.2 Búsqueda e identificación de espermatozoides.....	18
2.8.3 Antígeno prostático.....	20
2.9.3.1 Inmunoelectroforesis.....	20
2.9.3.2 Contraelectroforesis.....	22
2.9.3.3 Inmunoensayo enzimático.....	22
2.9 Marco Legal.....	26
2.9.1 Código Penal Federal.....	26
2.9.2 Dictamen Médico Legal.....	28
2.9.3 Casos de violación en México.....	33
3. Planteamiento del problema	35
4. Objetivos	35
5. Importancia del estudio	36
6. Limitaciones del estudio	36
7. Metodología	36
8. Análisis de la información	37
9. Conclusiones	42
10. Referencias bibliográficas	43

INTRODUCCIÓN

En México el estudio de delitos como la violación sexual es muy frecuente. Según cifras oficiales ocurre una violación cada cinco minutos ocupando el 70% del total de los casos denunciados en delitos sexuales.

En la actualidad la demostración legal de una violación requiere de un análisis a partir de la muestra de semen en la víctima. Una de las pruebas presuntivas o de orientación empleada para determinar la presencia de semen, es la medición de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida, aunque tiene la desventaja de que puede darnos resultados falsos positivos debido a que el semen no es el único lugar en donde puede encontrarse, por lo que se recurre a la identificación de células espermáticas; sin embargo, en las muestras biológicas en que no se encuentran estas células no resulta confiable basarse solamente en el análisis de la fosfatasa ácida, es por ello que se están utilizando otras determinaciones como métodos cristalográficos, biológicos o determinación de p30.

Una de las determinaciones que complementan el análisis es la presencia del *Antígeno Prostático Específico* (APE), el cual debe realizarse mediante un ensayo de electroforesis, con el cual se obtienen datos confiables, ya que tiene alta sensibilidad. Otras determinaciones para el antígeno prostático utilizan el método de ELISA, que aumentan su sensibilidad y especificidad al utilizar anticuerpos monoclonales, lo cual implica elevar costos para su utilización. Por lo tanto, el uso del APE por electroforesis ofrece buenos resultados que apoyarán a que se otorgue un dictamen certero en estos casos.

RESUMEN

La violación es un delito muy frecuente en nuestra sociedad, pero sólo el 30% de estos delitos son denunciados.⁵⁴ Actualmente la demostración legal de una violación requiere el análisis de una muestra de semen en la víctima, llevando a cabo una serie de pruebas de orientación para determinar la naturaleza de la muestra y finalizando con la búsqueda de espermatozoides para confirmar la presencia de líquido seminal. Sin embargo, no siempre se confirma la presencia de espermatozoides, ya sea como consecuencia de una vasectomía o por una degradación bacteriana. En estos casos la determinación del antígeno prostático puede realizarse como una prueba confirmatoria, ya que al ser específico de la próstata, su hallazgo es suficiente para confirmar la presencia de semen. Por lo tanto en este trabajo se investigó la utilidad del antígeno prostático (p30) para la detección de semen. Considerando que la determinación de éste puede realizarse por una reacción antígeno-anticuerpo. Además se investigó el procedimiento que se sigue en el laboratorio químico-forense para demostrar una violación. Dado lo anterior, se considerará la utilidad que tendrá este antígeno si se implementara en nuestro país como prueba confirmatoria en los laboratorios correspondientes.

MARCO TEÓRICO

Anatomía del aparato reproductor masculino.

El aparato reproductor masculino está conformado por una parte visible (externa) y otra oculta en el interior del cuerpo. Las partes visibles son el pene y el escroto. Este último es una bolsa de piel que cuelga de la región pelviana y que aloja a los dos testículos. Ocultos en el interior del cuerpo están la glándula prostática, las vesículas seminales, los conductos deferentes o espermáticos y los conductos eyaculadores.

Los testículos son las glándulas encargadas de producir los gametos masculinos o espermatozoides y las hormonas sexuales masculinas. Son de color blanquecino, superficie lisa y forma ovalada, y se encuentran suspendidos en la bolsa escrotal por los cordones espermáticos. El testículo izquierdo está a un nivel más bajo que el derecho. Están formados por numerosos lóbulos testiculares, aproximadamente 250, separados entre sí por tabiques, que concluyen en un ovillo, del que salen unos conductos enrollados, llamados túbulos seminíferos, que continúan hasta el epidídimo.

En las paredes de los túbulos seminíferos existen dos tipos de células: las seminales, que dan origen a los espermatozoides, y las células de Sertoli, que se encargan de sostenerlos y nutrirlos. Entre los túbulos hay unas células intersticiales o células de Leyding, encargadas de segregar las hormonas sexuales masculinas.

Los epidídimos son las estructuras en forma de C ubicadas detrás de cada testículo, donde maduran y almacenan los espermatozoides.

Los conductos deferentes comienzan en la parte inferior de la cola del epidídimo, acompañados de arterias, venas, vasos linfáticos y nervios, formando el cordón espermático que se introduce en la cavidad abdominal. Desembocan en dos dilataciones en forma de bolsa, ubicadas entre la base de la vejiga y el recto: las vesículas seminales. Estas se encargan de elaborar una secreción azucarada que proporciona energía al espermatozoide, y constituye la mayor parte del semen o líquido seminal.^{2,3}

Desde las vesículas seminales surgen los conductos eyaculadores, que desembocan en la uretra a nivel de la próstata. Esta última glándula, del tamaño de una castaña, rodea la uretra en su primera parte. Está formada por dos lóbulos laterales y uno intermedio, y tiene de 10 a 32 unidades glandulares insertadas en una masa de tejido muscular liso y conectivo denso.

La glándula prostática secreta un líquido lechoso que también constituye el semen, y que contiene una sustancia estimulante de los espermatozoides. Este fluido es descargado en la uretra durante la eyaculación.

La uretra se encarga de expulsar la orina y el semen desde el interior del cuerpo masculino. Está compuesta por tres partes: una ancha y dilatada que pasa a través de la próstata; otra membranosa, más corta y estrecha que la anterior, rodeada por haces de fibras musculares estriadas, que forman el esfínter (músculo circular que, al contraerse, cierra un orificio natural de la uretra); y la parte esponjosa, rodeada por el cuerpo esponjoso del pene, que es la más larga.

En la raíz del pene se encuentran las glándulas bulbouretrales o de Cowper, que vierten a la uretra un líquido viscoso que protege su interior de los residuos de la orina.

El pene es el órgano encargado de depositar los espermatozoides en el interior del cuerpo de la mujer. En su interior se encuentra la parte final de la uretra y un sistema de erección formado por tejido cavernoso. En términos generales, el pene se compone de una raíz, un cuerpo y un extremo denominado glande, cubierto por una porción de piel llamada prepucio, al que se une por un tirante de piel llamado frenillo prepucial.^{2,3}

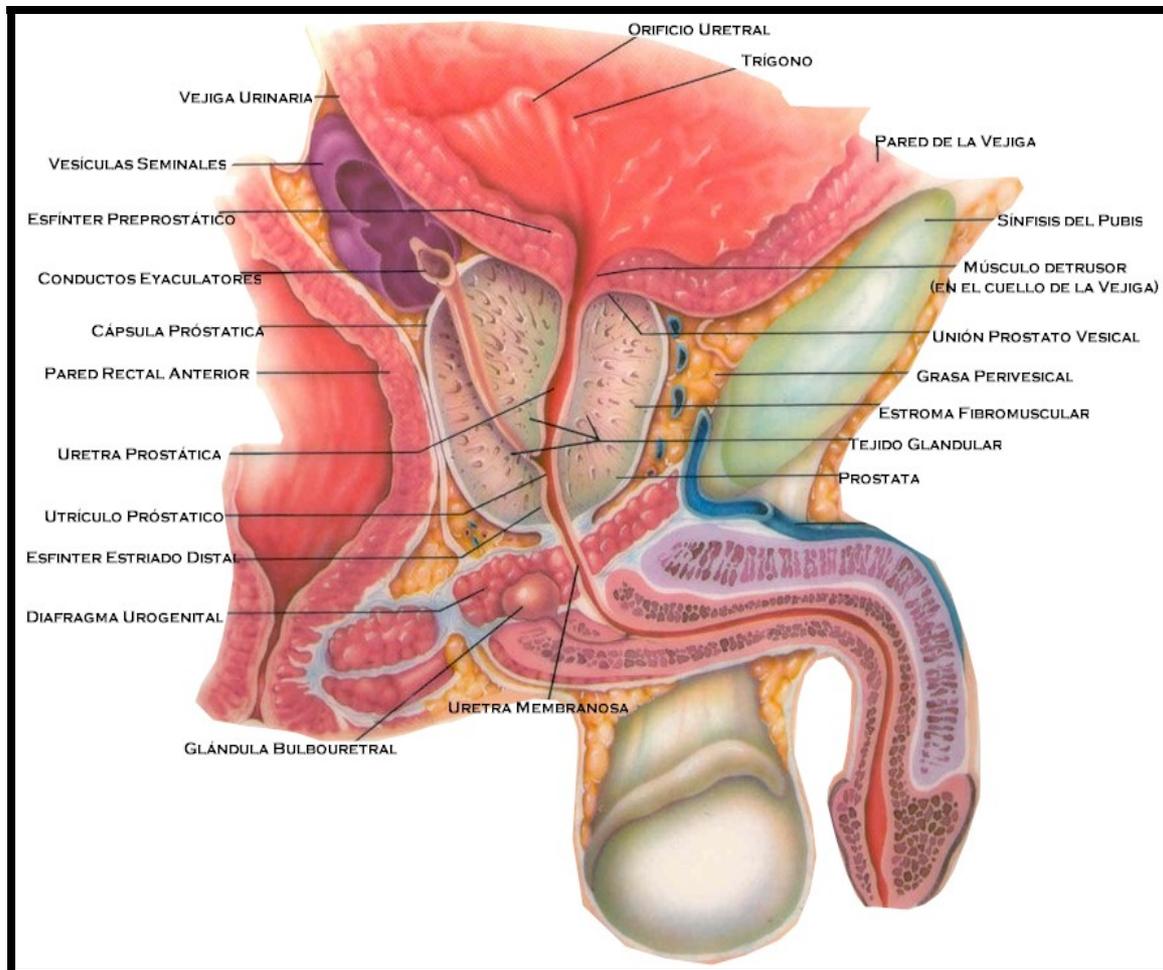


Figura 1. Aparato reproductor masculino.⁵³

Mecanismos de la erección, la eyaculación y detumescencia.

La erección esta controlada por el sistema nervioso parasimpático; resulta de la estimulación sexual, táctil, olfatoria, visual, auditiva, psicológica o de todas ellas. El sistema nervioso simpático controla la eyaculación.²⁹

La erección ocurre cuando el flujo sanguíneo se cambia a los espacios vasculares de los tejidos eréctiles (los cuerpos cavernosos y, en grado limitado, el cuerpo esponjoso) y ocasiona que el pene crezca y se torne turgente.³

La desviación del flujo sanguíneo que conduce a la erección está controlada por el sistema nervioso parasimpático después de la estimulación sexual. Los impulsos parasimpáticos desencadenan la liberación local de óxido nítrico, que relaja los músculos lisos de las ramas de las arterias profunda y dorsal del pene, e incrementa el flujo de sangre a este órgano. Conforme estos espacios se congestionan con sangre, el pene crece, se torna turgente y sobreviene la erección. Las venas del pene se comprimen y la sangre queda atrapada en los espacios vasculares del tejido eréctil para conservar el pene en estado erecto.

La estimulación continua del glándulo del pene origina la eyaculación, la expulsión forzada del semen de los conductos masculinos. Tras la erección, las glándulas bulbouretrales liberan un líquido viscoso que lubrica el recubrimiento de la uretra. Justo antes de la eyaculación la próstata elimina su secreción a la uretra y los espermatozoos de las ampollas de los conductos deferentes se liberan a los conductos eyaculadores. La secreción prostática ayuda a que los espermatozoides adquieran su motilidad. La secreción terminal que se agrega al semen es un líquido rico en fructosa, liberado de las vesículas seminales, que proporciona energía a los espermatozoos. Esta secreción forma gran parte del volumen del eyaculado. A diferencia de la erección, la eyaculación está regulada por el sistema nervioso simpático. Estos impulsos desencadenan la siguiente secuencia de fenómenos:

1. La contracción de los músculos lisos de los conductos genitales y las glándulas genitales accesorias fuerza el semen a la uretra.
2. El músculo esfínter de la vejiga urinaria se contrae e impide la salida de la orina (o la entrada del semen a la vejiga).
3. El músculo bulboesponjoso, que rodea el extremo proximal del cuerpo esponjoso (bulbo del pene), experimenta contracciones rítmicas potentes que dan por resultado la expulsión forzada de semen de la uretra.

La eyaculación va seguida del cese de los impulsos parasimpáticos a la vasculatura del semen. Como resultado, las derivaciones arteriovenosas se abren de nuevo, el flujo de sangre a través de las arterias profunda y dorsal del pene disminuye, y los espacios vasculares de los tejidos eréctiles se vacían lentamente de sangre a través del drenaje venoso.

De esta manera, el pene experimenta detumescencia y se torna flácido conforme la sangre sale de estos espacios vasculares.

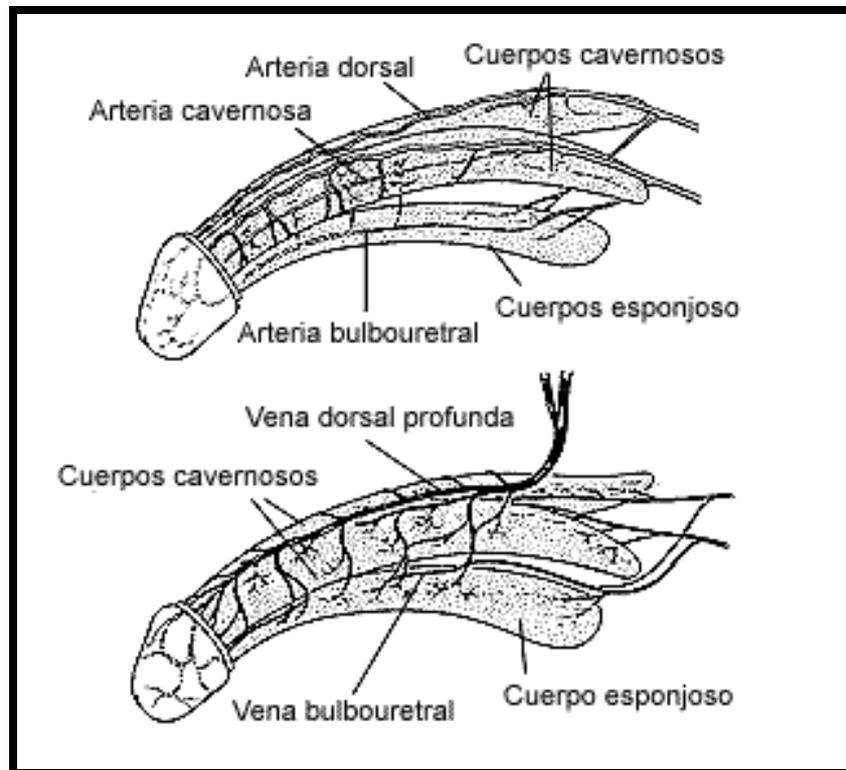


Figura 2. Flujo sanguíneo arterial del pene.⁵¹

EL LÍQUIDO SEMINAL

El volumen normal del eyaculado en los humanos es aproximadamente 3 mL, con oscilaciones entre los 2 a 5 mL, de los cuales menos del uno por ciento corresponde a los espermatozoides. El semen es una mezcla de secreciones del epidídimo, los vasos deferentes, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper, así como los espermatozoides que han madurado durante su paso por el epidídimo.¹⁴ En la mayoría de las especies, los espermatozoides, una vez formados en el testículo, se mezclan con un fluido, donde permanecen inmóviles y con un nivel de metabolismo muy bajo que se entiende como una necesidad de preservar las reservas energéticas espermáticas y disminuir los riesgos de alteraciones de membranas, estructuras internas y composición bioquímica por efecto de agentes oxidantes endógenos producidos por la actividad mitocondrial.^{1, 4, 51}

El plasma seminal, representa la porción del eyaculado en el cual los espermatozoides están suspendidos al tiempo de la eyaculación, proporcionando un medio para la movilidad de los mismos; algunos de sus componentes (glicoproteína HE5, CD5, etc.) se sabe que asisten al espermatozoide en la fertilización del ovocito. El líquido seminal también contiene sustancias que inhiben la capacidad fertilizante de los espermatozoides aunque de acción reversible. Entre los elementos presentes en el plasma seminal se encuentran inhibidores de la movilidad, estabilizadores del acrosoma e inhibidores de enzimas como la ATPasa y la fosforilasa.¹²

En el semen se encuentran unas vesículas membranosas llamadas prostasomas, secretadas por la glándula prostática, las cuales contienen grandes cantidades de colesterol, esfingomielina, iones Ca^{++} , proteínas (algunas de éstas son enzimas) y pequeñas moléculas que se cree participan en la respuesta inmune, la licuefacción del líquido seminal y la movilidad espermática.

Cuando un eyaculado no contiene espermatozoides, se dice que es *azoospermico*, esto puede ser derivado de varias causas, entre ellas una como lo es la vasectomía.

En la siguiente tabla se muestran algunas de sus características y la composición del semen:

Tabla 1. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN DEL SEMEN⁶

CARACTERÍSTICAS

Color	Blanco opalescente, grisáceo
pH	7.35 – 7.80
Densidad específica	1.028 g/mL
Cuenta normal	100 millones/ mL aproximadamente

COMPOSICIÓN QUÍMICA

De las vesículas seminales 60 por ciento del volumen total	Fructosa
	Fosforilcolina
	Ácido ascórbico
	Flavinas
	Prostaglandinas
	Ergotioneína
De la próstata 20 por ciento del volumen total	Ácido cítrico
	Colesterol
	Fosfolípidos
	Espermina
	Fibrinolisisina
	Fibrinogenasa
	Antígeno prostático
Amortiguadores	Fosfatos
	Bicarbonatos
Minerales	Cloruros
	Sodio
	Potasio
	Calcio
	Magnesio

Un análisis completo del líquido seminal nos informa sobre la normalidad del semen en su conjunto, tanto de la producción de espermatozoides como de la función de las glándulas sexuales accesorias. Para ello se realiza espermatobioscopia directa, indirecta, etc.

Algunos de los componentes del plasma seminal se pueden utilizar como marcadores de la función de las glándulas accesorias. Los contenidos de zinc y ácido cítrico permiten determinar la función de la próstata, así como la producción de fructosa que también es utilizada como un marcador de su función, por lo que concentraciones anormalmente bajas de ésta reflejan alteraciones de su estado secretor.¹⁷

Antígeno prostático.

El Antígeno Prostático Específico (APE) es una glicoproteína producida exclusivamente por la glándula prostática, su peso molecular es de 26479 D y esta formado por 237 aminoácidos. Normalmente es un componente del semen, y su función es licuar el semen después de la eyaculación. Prácticamente todo el antígeno prostático se excreta al exterior en las eyaculaciones del semen, pero una pequeña parte se escapa al torrente sanguíneo. La concentración de APE, se determina en muestras de suero y dado que se encuentra en concentraciones sumamente pequeñas (4ng/mL como límite normal), su detección requiere una tecnología con gran sensibilidad, que utiliza anticuerpos monoclonales. Estas determinaciones se realizan como una prueba para detección de posible cáncer prostático o para ver la evolución del tratamiento a éste.^{1, 13, 50}

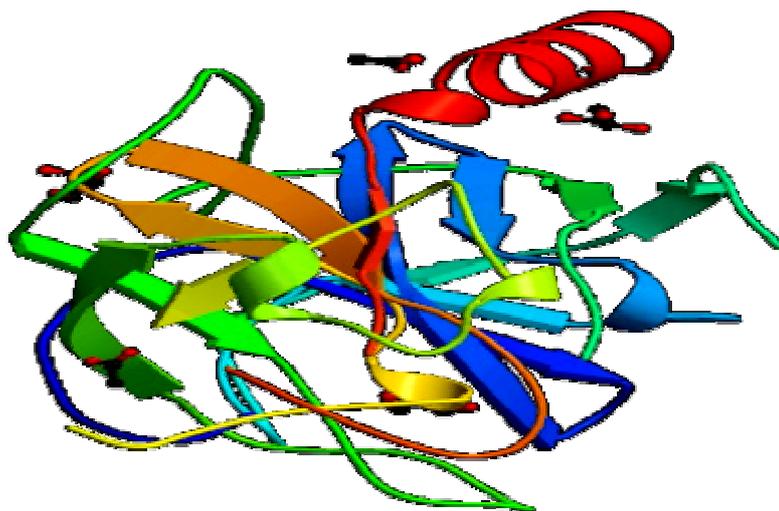


Figura 3. Imagen 3D del antígeno prostático.⁵⁶

El antígeno prostático puede existir en la sangre en forma libre, o unirse a proteínas en la sangre. Cuando se encuentra en forma libre, se conoce como APE libre, cuando está unido a otras sustancias, se conoce como APE en forma de complejos. El APE total, es la suma de ambas formas de APE y es lo que miden los análisis de sangre habitualmente.

En química forense para el estudio de delitos sexuales se realizan análisis que conducen a evaluar ya sea la presencia de espermatozoides, fosfatasa ácida o APE.

La determinación del antígeno prostático puede realizarse como ya se mencionó por medio de reacciones antígeno-anticuerpo, siendo la más sensible la que se realiza con anticuerpos monoclonales.

En la primera fase se inocular a un ratón el antígeno contra el que se desean producir los anticuerpos monoclonales (en este caso el APE), hasta conseguir una buena inmunización. A continuación se extrae el bazo del animal inmunizado y se fusiona con células de mieloma para formar los hibridomas que se seleccionarán en virtud del anticuerpo producido.⁸

Tabla 2. Etapas de la producción de anticuerpos monoclonales.⁸

ETAPAS DE PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS
1. Obtención del antígeno.
2. Inmunización.
3. Fusión.
4. Restricción del crecimiento a los híbridos formados.
5. Selección de los hibridomas positivos.
6. Clonaje y estabilización.
7. Caracterización.

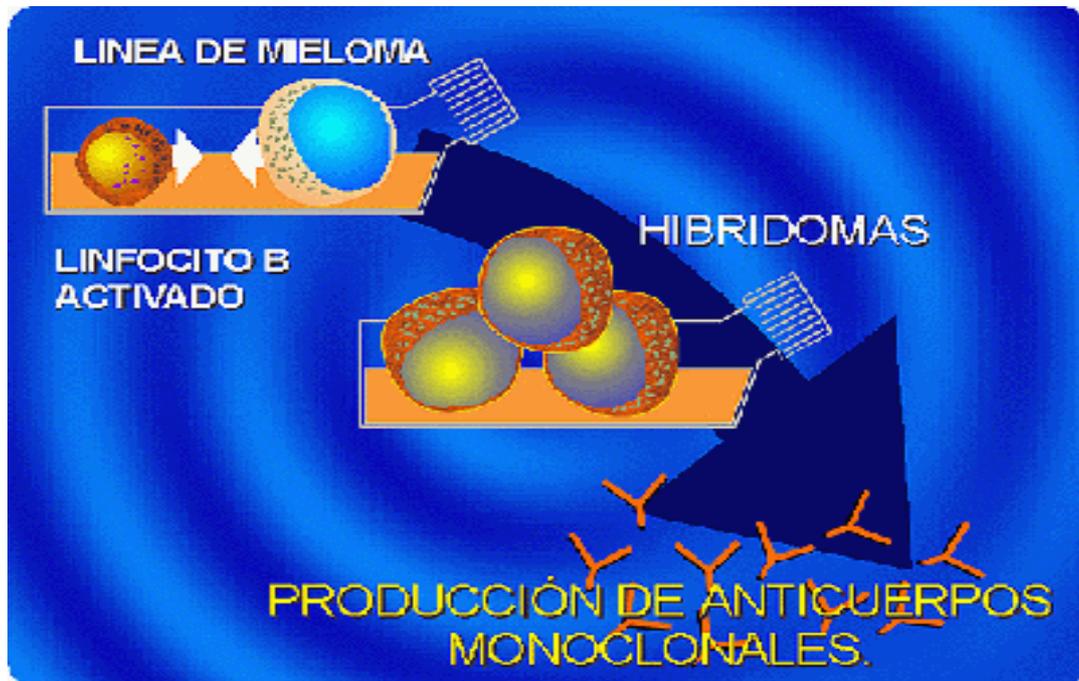


Figura 4. Esquema de producción de anticuerpos monoclonales.⁵²

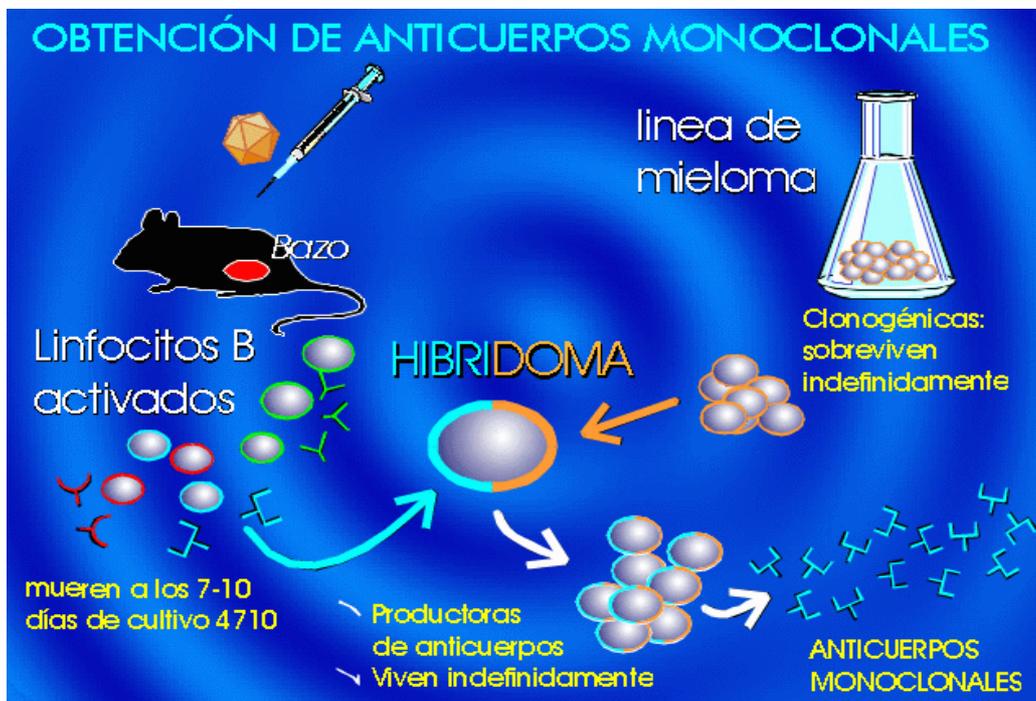


Figura 5. Esquema total de la producción de anticuerpos monoclonales.⁵²

Tabla 3. Comparación entre la sensibilidad de técnicas para detectar anticuerpos. ⁵²

Sensibilidad de las diferentes técnicas para la detección de anticuerpos	
Método	Sensibilidad (µg/mL)
Precipitación en gel	30
Precipitación en anillo	18
Fijación de complemento	0.05
Inmunofluorescencia	0.005
ELISA	0.0005

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El primer reporte de las células espermáticas, data del siglo XVII: Luis de Hamm, en el año de 1667, tuvo la idea de colocar en el microscopio una gota de semen humano y fue quien tuvo la primicia de observar la multitud de espermatozoides presentes. Probablemente los espermatozoides ya habían sido vistos anteriormente por Nicolás Hartsoeker, pero su descubrimiento no fue hecho público. Así pues en 1667 el espermatozoide fue visto, identificado y descrito.

El francés Albert Florence descubrió una de las primeras técnicas para reconocer huellas de líquido seminal; se basaba en el hecho de que, al tratar una muestra de este espécimen con una solución concentrada de iodo alcalino, se producían cristales rómbicos de color rojo parduzco, formados por la colina libre. Al ser descubiertos los rayos ultravioleta por Kirchhoff y Bunsen (1859), se observó que las manchas de semen adquirían bajo esa radiación una fluorescencia azulada. Por otro lado, Barberio un médico italiano, trató las manchas seminales con solución de ácido pícrico y obtuvo cristales amarillos de picrato de espermina. Sin embargo, Balthazard, observó que las reacciones de Florence y Barberio aún cuando son útiles en algunos casos, no son fiables. Sus resultados no son concluyentes ni característicos: positivos no permiten afirmar la presencia del esperma; negativos no permiten concluir su ausencia. ¹⁵

Fishman y Lerner en 1953 dan a conocer su método para estimar la fosfatasa ácida de origen prostático. El alemán S. Berg en 1954 describe el empleo del alfa naftil fosfato de calcio que reacciona con el esperma, dejando libre alfa naftol, que a su vez reacciona con dianizil tetrasonio formando un colorante azoico violeta. Kind, reporta esta técnica para determinar fosfatasa ácida seminal en 1964 en la revista *Forensic Science*. Willot en 1972, incluye en la misma revista un procedimiento por el cual el ácido L-tartárico inhibe las fosfatasas seminal y vaginales. Dos años más tarde, Adams y Brian de la Policía Metropolitana de Londres, dan a conocer una técnica electroforética, por medio de la cual, cuando se hayan encontrado resultados positivos por el procedimiento de Willot, es posible diferenciar las fosfatasas de origen prostático y las presentes en las secreciones vaginales, así como las procedentes de vegetales. En el año de 1978, Sensabaugh aísla una proteína específica del semen humano: la proteína p30 y en 1983, describe un procedimiento para su detección por inmunoensayo. E indudablemente el paso de la Serología Forense en el siglo XX, que abarca desde que se da el descubrimiento del ADN celular (1989), técnica mediante la cual, una vez identificada una muestra de líquido seminal, es posible individualizarla a través de su patrón genético.¹⁵

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Un examen ideal sería el de obtener una muestra con semen fresco (el que mantiene condiciones organolépticas)¹⁹. Sin embargo, la mayoría de las veces no puede tenerse una muestra ideal, por lo que debe analizarse lo más rápido posible. Las preguntas que se tienen al hallar una mancha en el lugar del hecho son: ¿ la mancha es de semen?, ¿la mancha es de esperma humano? y ¿ se puede determinar a quién pertenece y su relación con el delito?, estas preguntas pueden ser contestadas siempre y cuando se realice una buena cadena de custodia y se tenga un buen análisis de la muestra.

Las regiones del hallazgo de la muestra pueden ser tres:

- Sobre la víctima. Buscando en ropa, cuerpo, cabello, vello púbico, vagina, recto y boca (si la agredida refiere agresión en esas zonas).
- Sobre el agresor. En sus ropas o en su cuerpo.
- En el ambiente. En los muebles, piso, paredes, u otros objetos.

Para la recolección de muestras, es necesario que el observador de campo lleve en su maletín de trabajo:

- Tubos de ensaye de 15cm de largo por 1cm de ancho, que contendrán en su interior dos hisopos hechos en aplicadores de madera de 15cm de longitud y que habrán sido esterilizados.
- Laminillas porta objetos.
- Ampolletas de solución salina estéril.

La toma de muestra en la víctima deberá efectuarse únicamente mediante la intervención de profesionales altamente calificados y del mismo sexo de la persona agredida, a fin de garantizar absoluta seriedad, discreción y respetabilidad. El procedimiento consiste en tomar las muestras de la cavidad vaginal y/o anal (también puede tomarse del vello púbico, cabellos, etc.), por medio de los hisopos contenidos en los tubos, tomando éstas a la mayor profundidad posible.^{16, 17}

En el cadáver que se investigue y se desee obtener muestra puede tomarse del cuerpo, vello púbico, cabello, vagina, recto y boca.

Manejo de muestras:

Deberán tomarse tres muestras como mínimo:

- a) Al extraer el hisopo de la cavidad estudiada, se hará de inmediato un frotis sobre una laminilla, teniendo especial cuidado de no pasar más de una vez el algodón del hisopo, sobre la misma superficie:

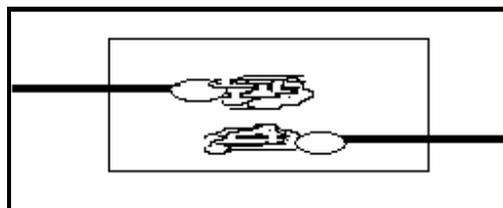


Figura 6. Forma de realizar un frotis adecuado.¹⁵

A continuación se fijará el frotis aplicando la flama de un encendedor por debajo de la laminilla, si se está en el lugar de los hechos y la flama del mechero, si el investigador se encuentra en el laboratorio; a continuación se introducirá ese mismo aplicador en su tubo y se añadirán aproximadamente 2mL de solución salina estéril, tapando el tubo de inmediato. Esta muestra será muy útil para su observación microscópica en fresco.

La adecuada toma y fijación del frotis en un tiempo lo más pronto posible al momento de ocurridos los hechos, nos brindará la oportunidad de visualizar al microscopio los espermatozoides y por lo tanto de identificar el semen sin lugar a dudas y por otra parte se puede almacenar como prueba de lo afirmado.

- b) Se tomará una segunda muestra con el hisopo humedecido con unas gotas de solución salina, mismo que se trasladará al tubo marcado como “2”, que se destinará para la búsqueda de fosfatasa ácida y su cuantificación, si ésta es posible.
- c) La tercera muestra tomada en idénticas condiciones, se destinará para futuras aclaraciones o confrontas.

En los cadáveres se tomarán las muestras en iguales condiciones, siempre lo más rápidamente posible para evitar la acción de la putrefacción sobre las muestras. De preferencia deberá tomarse una muestra más durante la necropsia a fin de obtener el espécimen a estudiar, del interior del cuerpo con menos riesgo de contaminación. Las prendas de ropa interior, sábanas, pañuelos desechables, o cualquier otro objeto que se considere relacionado con el hecho, se embalará en bolsas de plástico cancelándolas con una etiqueta, en donde además de los datos usuales se anotará el lugar de donde se recolectó, previa fijación por medio de la fotografía y fé ministerial.

Todas las muestras tomadas deberán llevar etiquetas firmemente adheridas en las que se anotarán los siguientes datos:

1. Número de averiguación previa o expediente.
2. Fecha y hora en que se recolectó la evidencia.
3. Nombre de la persona a quien se le tomó.
4. Nombre del investigador que realizó la toma.

ESTUDIO QUÍMICO FORENSE DE MUESTRAS PRESUNTIVAS DE SEMEN.

DETECCIÓN DE HUELLAS DE SEMEN.

Lámpara de Wood.

La *lámpara de Wood* que emite luz ultravioleta en su funcionamiento, ha sido utilizada en la investigación del delito sexual y crea una fluorescencia cuando detecta semen en la piel, aún en casos de 72 horas de historia de evolución. Su uso, está limitado debido a que no solo emite fluorescencia por la presencia de semen, por lo tanto se obtienen falsos positivos. El líquido espermático, contiene flavinas en alta concentración y son las responsables de impartir fluorescencia blanco verdosa al semen cuando las manchas de éste son observadas a la luz ultravioleta; por lo tanto este procedimiento es de gran utilidad para la localización topográfica de posibles huellas espermáticas, tanto en el lugar de los hechos como en prendas de vestir. Recientemente también se utiliza el rayo láser para este fin.^{15, 17}

Figura 7. Lámpara fluorescente.⁴²

Fosfatasa ácida.

La presencia de *fosfatasa ácida* es menos específica de contacto sexual. Esta puede encontrarse normalmente en las secreciones de la mujer, tanto en la vagina como en muestras de orina, aunque en menor concentración en comparación con las secreciones prostáticas. La fosfatasa ácida está presente en los géneros animal y vegetal; por tratarse de una enzima, tiene la propiedad de hidrolizar los esterios alifáticos y aromáticos del ácido ortofosfórico. Por lo

que se refiere a los fluidos corporales humanos, se ha demostrado que en el líquido seminal se encuentra en concentraciones de 20 a 400 veces más que en otros fluidos; por lo tanto, la presencia de semen en manchas sospechosas se puede detectar por el hallazgo de elevadas cantidades de fosfatasa ácida.^{15,16}

Es importante ajustar los reactivos utilizados para su detección, de manera que solamente se obtenga reacción positiva cuando la enzima citada se encuentre en cantidades mayores a 20 unidades. La fosfatasa ácida del esperma reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; este reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso.

No obstante que está aceptado que sólo en el líquido seminal existen grandes concentraciones de fosfatasa ácida, es importante señalar que una prueba positiva no es concluyente para afirmar que una mancha es de semen, ya que puede encontrarse en otros tejidos o plantas.

Kind, Hauck y Leithoff¹⁵ han encontrado una lista de productos y especímenes que contienen la enzima:

- Bacterias
- Coliflor
- Leche humana
- Trébol
- Hígado humano
- Semillas de alfalfa
- Orina humana
- Veneno de víbora
- Riñón humano
- Almendras dulces
- Exudado vaginal
- Coles de Bruselas
- Glóbulos rojos
- Caracoles
- Cereal de arroz
- Moho de hongos

Dado lo anterior, la técnica de la detección de la fosfatasa ácida está catalogada como una reacción de orientación y por lo tanto la presencia de semen deberá confirmarse con el hallazgo de los espermatozoides.



Figura 8. Toma de muestra para la determinación de fosfatasa ácida. ⁵³

BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.

La certeza de que una muestra corresponde a semen, se da sin lugar a duda con el hallazgo de los espermatozoides en el espécimen analizado. El espermatozoide humano está formado por una cabeza de forma oval que mide 4.6x 2.6x1.5 micras; una pieza intermedia que contiene las mitocondrias y una cola formada por nueve filamentos que rodean a otras dos centrales. En los animales, la cabeza tiene diferente forma y dimensiones. Debido a que las bacterias atacan su tallo primeramente, en las muestras contaminadas se hace difícil la identificación, las opiniones de los autores en cuanto a la vida media de los espermatozoides están divididos: márgenes desde 30 minutos hasta 12 horas y hay quien describe promedios de vida hasta 12 días dependiendo de ciertos factores como: grado de humedad, la presencia de bacterias, pH, temperatura, etc.

La identificación de células espermáticas puede realizarse con tinción de Gram, con azul de metileno o la técnica de Christmas Tree. Se realizan frotis ya sea de impronta o bien por concentración de la muestra por centrifugación y fijación por calor para su observación al microscopio.

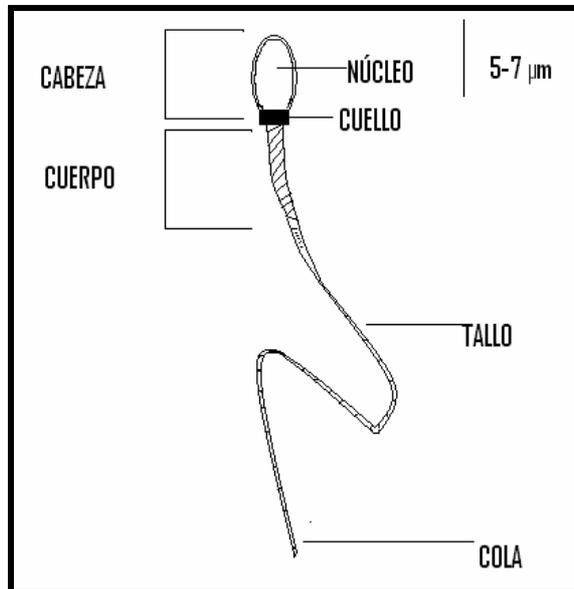


Figura 9. Morfología del espermatozoide ⁵³

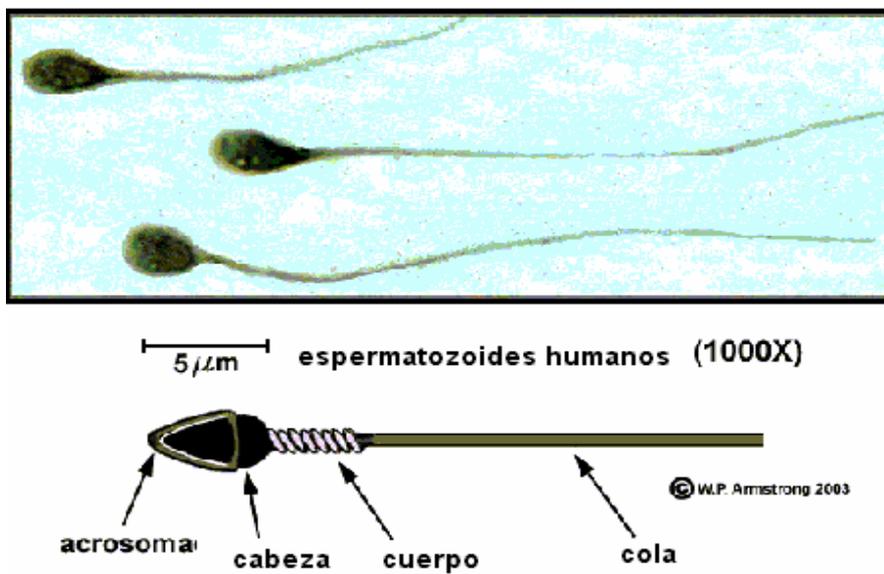


Figura 10. Comparación entre espermatozoides vistos al microscopio y una imagen señalando sus partes. ⁵³

Antígeno Prostático específico.

La *proteína prostática*, p30 o APE (antígeno prostático específico), es encontrado en el fluido seminal y orina del hombre bajo circunstancias normales. Esta determinación puede realizarse por medio de Inmunolectroforesis, contra inmunolectroforesis o por ELISA, siendo por lo menos 100 veces más sensible que la fosfatasa ácida.^{41,42}

Inmunolectroforesis.

Es de gran utilidad cuando se trata de probar pureza o especificidad de reactantes o sustancias problema. Se utilizan placas de agar o agarosa, en las que se han hecho pequeñas perforaciones desplazadas hacia uno de los extremos de la placa. En estas perforaciones se colocan los antígenos o las mezclas antigénicas a analizar y entonces se aplica la corriente eléctrica. Aquellos componentes que poseen una carga negativa migran hacia el ánodo y aquellos con una carga positiva migrarán hacia el cátodo. Habrá componentes antigénicos que se muevan más rápida o más lentamente hacia alguno de los dos electrodos, dependiendo de su carga y de la intensidad de la misma. Al suspender la corriente eléctrica, se hacen canales adyacentes a las perforaciones y paralelos al sentido de la corriente eléctrica. En estos canales se depositan alícuotas de los antiseros correspondientes y el sistema de reacción se deja en reposo varias horas, generalmente de un día para otro, hasta que aparecen los arcos de precipitación correspondiente a los sistemas probados.⁸

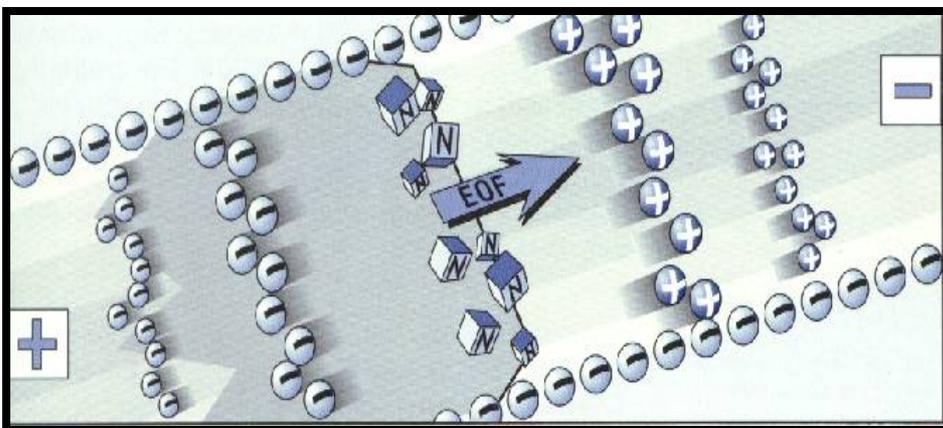


Figura 11. Migración de sustancias en la inmunolectroforesis.⁵⁵

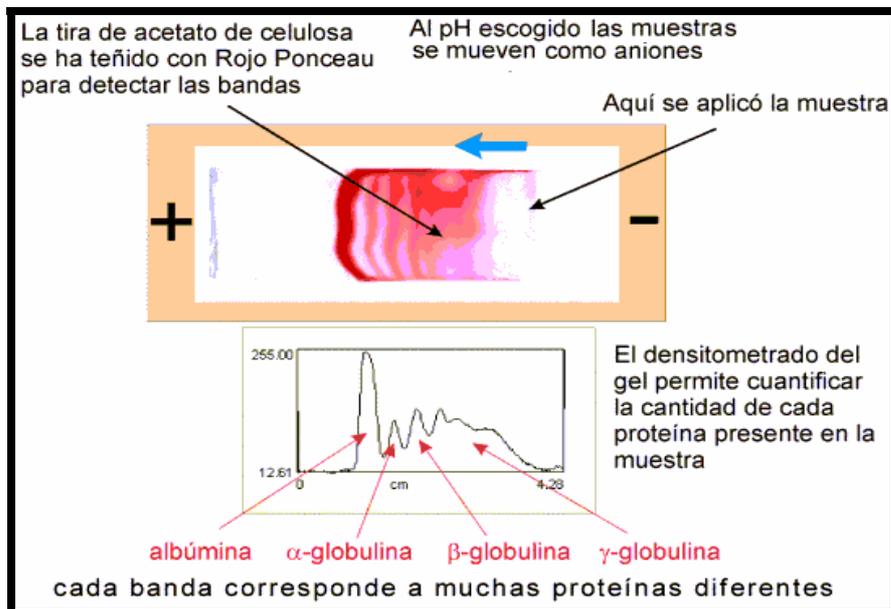


Figura 12. Ejemplo de un corrimiento electroforético en gel.⁵⁵

Contrainmunoelectroforesis.

En los geles se hacen una serie de perforaciones, de tal manera que una de las series quede orientada hacia el extremo catódico de la placa y la otra hacia el extremo anódico de la misma. En la serie de perforaciones orientadas hacia el cátodo se depositan las muestras de antígeno, mientras que en la serie de perforaciones orientadas hacia el ánodo se colocan los antisueros o anticuerpos correspondientes. Las moléculas del antígeno migrarán hacia el ánodo, dependiendo de su intensidad de carga; mientras que las moléculas de anticuerpo se desplazarán hacia el cátodo principalmente arrastrados por los cationes de la solución electrolítica, esto es, por electroendósmosis o reoforesis (el anticuerpo migra prácticamente sin carga arrastrado por los cationes de la solución electrolítica). Los resultados positivos se observan como bandas de precipitación entre los pares de perforaciones encontradas.⁸

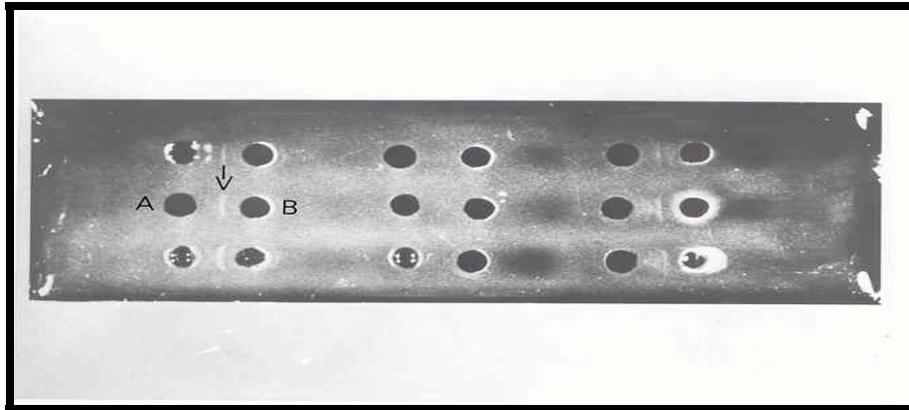


Figura 13. Bandas reveladas en una reacción antígeno-anticuerpo por contrainmunolectroforesis.⁵⁵

Inmunoensayo enzimático.

Es una técnica en la cual uno de los reactantes, el antígeno o el anticuerpo, se fija a un soporte sólido antes de su interacción con el reactante complementario. Debido a esta característica en la técnica, ésta se describe como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). La técnica es muy versátil

y por ello hay diversas variantes de la misma dentro de las cuales las más comunes son el ELISA directo, indirecto y en sandwich o de captura. En la técnica directa e indirecta, el antígeno se absorbe sobre una fase sólida, en el de sandwich las placas se sensibilizan con anticuerpos dirigidos contra el antígeno problema. El ELISA directo comúnmente se utiliza para cuantificar antígenos conocidos, el indirecto, para buscar y cuantificar anticuerpos contra antígenos conocidos y el de sandwich o de captura se utiliza para la búsqueda y cuantificación de antígenos.^{8, 52}



Figura 14. Placas para realizar ensayos de ELISA.⁵²

Figura 15. Ejemplo de la coloración de una reacción positiva en ensayo de ELISA.⁵²



Figura 16. Fases de la técnica Elisa en Sandwich. (1) Un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-antígeno suele estar ya unido a la placa. (2) se incuba con la muestra problema. (3) se añade el conjugado. (4) por último el sustrato. Todos los pasos van precedidos de incubaciones y lavados.⁵²



Figura 17. Fase de la técnica Elisa indirecto. (1) El antígeno se pega a la placa (2) Se añade el suero problema. (3) posteriormente, el conjugado. (4) y por último, el sustrato.⁵²

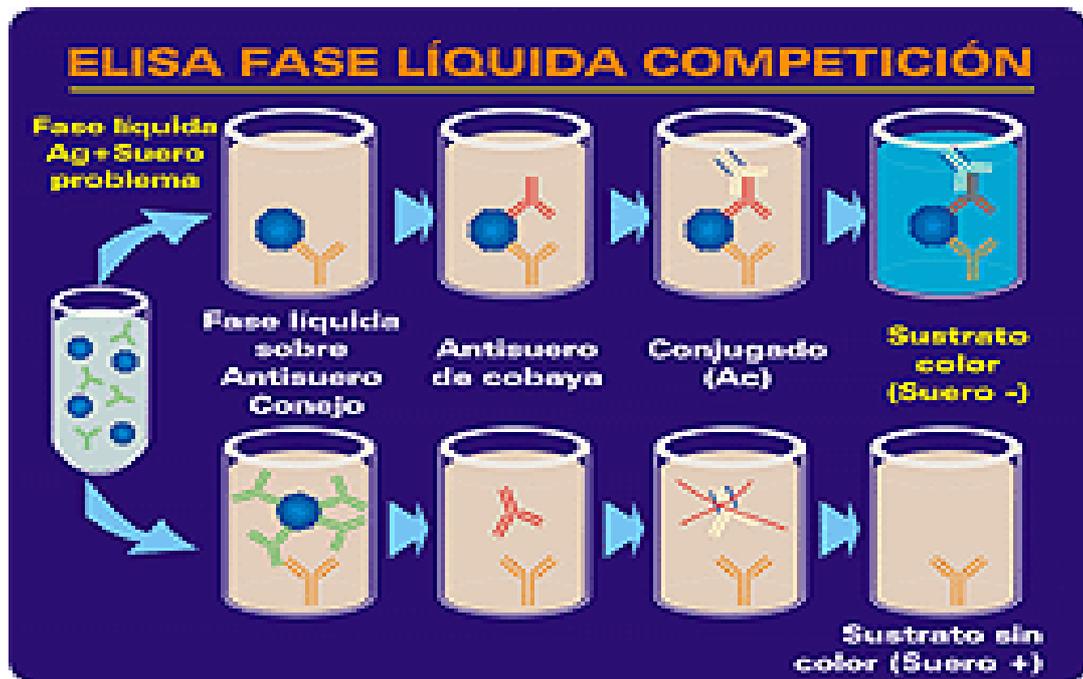


Figura18. Fases de la Técnica Elisa de competición. (1) Se incuba el suero problema con el antígeno. (2) La mezcla anterior se deposita sobre los pocillos donde previamente se ha fijado un suero anti-antígeno (3) se añade el conjugado. (4) después, el sustrato. En este caso la ausencia de color sería positivo.⁵²

MARCO LEGAL ^{27, 28}

Se entiende por sexo al conjunto de características somáticas, funcionales y psíquicas que distinguen al hombre de la mujer.

Los hechos que son considerados delitos sexuales comprenden:

Violación. Al que por medio de la violencia física o moral tenga cópula, sin la voluntad de la persona ofendida y sea cual fuere su sexo.

Estupro. Se llama estupro al tener cópula con una mujer menor de dieciocho años de edad, casta y honesta, obteniendo consentimiento por medio de la seducción o el engaño.

Hostigamiento sexual. Al que con fines lascivos asedie reiteradamente a personas de cualquier sexo, valiéndose de su posición jerárquica derivada de sus relaciones laborales, docentes, domésticas o cualquiera otra que implique subordinación.

CÓDIGO PENAL FEDERAL ³²

TITULO DECIMOQUINTO DELITOS CONTRA LA LIBERTAD Y EL NORMAL DESARROLLO PSICOSEXUAL.

CAPÍTULO 1

Artículos con relación al hostigamiento sexual, estupro y violación.

Artículo 259 BIS. Al que con fines lascivos asedie reiteradamente a personas de cualquier sexo, valiéndose de su posición jerárquica derivada de sus relaciones laborales, docentes, domésticas o cualquiera otra que implique subordinación, se le impondrá sanción hasta de cuarenta días de multa. Si el hostigador fuese servidor público y utilizare los medios o circunstancias que el encargo le proporcione, se le destituirá de su cargo.

Solamente será punible el hostigamiento sexual, cuando se cause un perjuicio o daño.

Sólo se procederá contra el hostigador, a petición de la parte ofendida.

Artículo 260. Al que sin consentimiento de una persona y sin el propósito de llegar a la cópula, ejecute en ella un acto sexual o la obligue a ejecutarlo, se le impondrá una pena de seis meses a cuatro años de prisión.

Si hiciere uso de la violencia física o moral, el mínimo y máximo de la pena se le aumentarán hasta en una mitad.

Artículo 261. Al que sin el propósito de llegar a la cópula, ejecute un acto sexual en una persona menor a doce años de edad o persona que no tenga la capacidad de comprender el significado del hecho o que por cualquier causa no pueda resistirlo o la obligue a ejecutarlo, se le aplicará una pena de dos a cinco años de prisión.

Si hiciere uso de la violencia física o moral, el mínimo y máximo de la pena se le aumentarán hasta en una mitad.

Artículo 262. Al que tenga cópula con una persona mayor de doce años y menor de dieciocho, obteniendo su consentimiento por medio de engaño, se le aplicará de tres meses a cuatro años de prisión.

Artículo 263. En el caso del artículo anterior, no se procederá contra el sujeto activo, sino por queja del ofendido o de sus representantes.

Artículo 265. Al que por medio de la violencia física o moral realice cópula con persona de cualquier sexo, se le impondrá prisión de ocho a catorce años. Para los efectos de este artículo, se entiende por cópula, la introducción del miembro viril en el cuerpo de la víctima por vía vaginal, anal u oral, independientemente de su sexo.

Se considerará también como violación y se sancionará con prisión de ocho a catorce años, al que introduzca por vía vaginal o anal cualquier instrumento distinto al miembro viril, por medio de la violencia física o moral, sea cual fuere el sexo del ofendido.

Artículo 265 BIS. Si la víctima de la violación fuera la esposa o concubina, se impondrá la pena prevista en el artículo anterior.

Artículo 266. Se equipara a la violación y se sancionará con la misma pena:

- I. Al que sin violencia realice cópula con persona menor de doce años de edad;

-
-
- II. Al que sin violencia realice cópula con persona que no tenga la capacidad de comprender el significado del hecho o por cualquier causa no pueda resistirlo; y
 - III. Al que sin violencia y con fines lascivos introduzca por vía anal o vaginal cualquier elemento o instrumento distinto del miembro viril en una persona menor de doce años de edad o persona que no tenga la capacidad de comprender el significado del hecho, o por cualquier causa no pueda resistirlo, sea cual fuere el sexo de la víctima.

Si se ejerciera violencia física o moral, el mínimo y máximo de la pena se aumentarán hasta en una mitad.

Artículo 266 BIS. Las penas previstas para el abuso sexual y la violación se aumentarán hasta en una mitad en su mínimo y máximo, cuando:

- I. El delito fuere cometido con intervención directa o inmediata de dos o más personas;
- II. El delito fuere cometido por un ascendiente contra su descendiente, éste contra aquél, el hermano contra su colateral, el tutor contra su pupilo, o el padrastro o amasio de la madre del ofendido en contra del hijastro. Además de la pena de prisión, el culpable perderá la patria potestad o la tutela, en los casos en que la ejerciere sobre la víctima;
- III. El delito fuere cometido por quien desempeñe un cargo o empleo público o ejerza su profesión, utilizando los medios o circunstancias que ellos le proporcionen. Además de la pena de prisión, el culpable será destituido del cargo o empleo o suspendido por el término de cinco años en el ejercicio de dicha profesión; y
- IV. El delito fuere cometido por la persona que tiene al ofendido bajo su custodia, guarda o educación o aprovecha la confianza en él depositada.

EL DICTAMEN MÉDICO- LEGAL. ¹⁸

A. El dictamen médico legal en víctimas.

Se debe verificar que el informe pericial conste de los siguientes rubros, comprendiendo los aspectos que en cada uno se indica:

1. Introducción, donde se anotan: el nombre de la institución a la que pertenece el perito que lo realiza, su cargo en la misma, quién solicitó el

peritaje o si éste se realiza por designación y el número de expediente al cual está vinculado.

2. Objetivo(s) de la peritación, en este rubro se plantea el problema o los problemas a resolver con base a lo referido en la denuncia o queja; en los cuestionamientos o dudas expresados por la autoridad en su solicitud.
3. Antecedentes. En donde se transcribirán los datos relevantes y necesarios para el diagnóstico, de las declaraciones, diligencias, peritajes, etc., que se encuentren en el expediente, además de: en las mujeres los antecedentes ginecoobstétricos (inicio de vida sexual activa, fecha de última menstruación, fecha de último parto, si utiliza algún método anticonceptivo), si padece alguna enfermedad venérea, adicciones e ingesta actual de medicamentos, si tuvo o no relaciones sexuales con su pareja (especificando fecha y hora).

Realizar una breve historia clínica que incluya:

A. El interrogatorio. En cuyo contenido se tiene que reportar:

- a) La ficha de identificación (sexo, edad, religión, ocupación, nacionalidad, idioma o dialecto).
- b) El estado mental, a fin de valorar:
 - Si existe alteración de la percepción, del juicio, cambios de personalidad o del comportamiento.
 - La orientación en las tres esferas (tiempo, lugar y persona).
 - El nivel de consciencia (alerta, confusa, somnolienta, estuporosa, en estado de coma).
 - La atención (si está concentrada en lo que se dice o está distraída).
 - La afectividad (estado de ánimo), para conocer si está deprimida, angustiada, indiferente, etc.
 - El lenguaje, evaluando dos parámetros; el pensamiento, verificando si el lenguaje es coherente y congruente y la valoración del lenguaje externo, esto es, si existen trastornos en la articulación de las palabras o en la emisión de fonemas (disartria o disalalia).

c) El lugar, la hora y fecha en que sucedieron los hechos.

a) La descripción de los acontecimientos, señalando las características del agresor o agresores (edad aproximada, estatura, constitución física, vestimenta, señas particulares) y todo lo que sirva para su identificación; cuál fué la forma de lograr el acceso (amenazas, sometimiento mediante golpes, ataduras, armas, etc.); si el acceso tuvo lugar por el ano, boca o vagina en el caso de las mujeres.

B. La exploración física completa que incluya:

- Los signos vitales.
 - La inspección. En la cual deben investigarse los siguientes datos: edad aproximada, sexo, estado de la ropa, actitud, integridad, conformación, deambulacion, facies.
 - La edad clínica probable.
 - Las lesiones, efectuando su descripción.
 - En las mujeres la exploración ginecológica, especificando detalladamente los hallazgos; lesiones, tipo de himen, en particular debe referirse si éste presenta desgarros, así como la ubicación de acuerdo a la carátula del reloj, características y si son recientes o no.
 - La exploración proctológica, detallando los descubrimientos, tales como: las características de los pliegues y del esfínter anal; la presencia de desgarros, su probable tiempo de evolución y/o cicatrices.
 - La búsqueda de pelos, fibras y secreciones, tanto en la ropa como en el cuerpo (orificios naturales: boca, vagina y recto) y en las uñas.
 - Intoxicación aguda con alcohol, estupefacientes o psicotrópicos.
4. Comentarios, en donde se realiza el análisis objetivo de la información obtenida.
5. Conclusiones. Las cuales deben ser contundentes y claras.

-
-
6. La hora y fecha en que se efectuó el estudio y el nombre la firma de quien elaboró el dictamen. Se deberán anexar dibujos del cuerpo humano que incluyan los genitales y la región anal, en donde se señalen los hallazgos encontrados en la exploración física, ginecológica y proctológica.

B. El dictamen médico-legal del presunto agresor (andrológico).¹⁸

1. Introducción.

2. Objetivos.

3. Antecedentes. En donde se transcribirán los datos relevantes y necesarios para el diagnóstico, de las declaraciones, diligencias, peritajes, etc.

- Los antecedentes quirúrgicos (vasectomía), psiquiátricos, de disfunción sexual (azoospermia, oligospermia, impotencia sexual), infecciosos, adicciones, alcoholismo, ingesta actual de medicamentos.

Realizar una breve historia clínica que incluya:

a) La ficha de identificación (sexo, edad, religión, ocupación, nacionalidad, idioma o dialecto).

b) La exploración física completa que incluya:

- Los signos vitales.
- La inspección. En la cual deben investigarse los siguientes datos: edad aproximada, sexo, estado de la ropa, actitud, integridad, conformación, deambulacion, facies.
- La edad clínica probable.
- Las lesiones (si presenta), efectuando su descripción; es importante buscar lesiones producidas por la víctima como podrían ser los estigmas ungueales, excoriaciones lineales (rasguños), mordidas, etc.
- La exploración andrológica, especificando detalladamente los hallazgos; en particular, debe referirse al desarrollo genital, a las

lesiones (equimosis, laceraciones o ruptura a nivel del frenillo, excoriaciones y / o edema de prepucio o glande), la búsqueda de materias fecales, otros elementos (fibras, pelos) y secreciones, además, se pide que se oprima el meato urinario para observar si existe salida de alguna sustancia de la cual se debe tomar muestra para detectar semen.

- Tanto en el pene como en la ropa y el cuerpo, se debe efectuar la búsqueda de pelos, fibras, secreciones, células vaginales, restos de excremento o sangre.
- Intoxicación aguda con alcohol, estupefacientes o psicotrópicos.

4. Comentarios. Donde se realiza el análisis objetivo de la información obtenida.

5. Conclusiones. Las cuales deben ser contundentes y claras.

6. La hora y fecha en que se efectuó el estudio y el nombre y firma de quien elaboró el dictamen.

D. El examen psicológico y/o psiquiátrico. ¹⁸

Cuando la víctima experimenta abuso sexual, existen condiciones en su estado mental que aumentan el grado de sospecha, como son:

- a) Alteraciones en el apetito o sueño.
- b) Depresión.
- c) Histeria.
- d) Ideación suicida.

Por lo tanto, es importante verificar que se lleven a cabo estudios por profesionales en el área de la psicología y/o psiquiatría, para detectar y efectuar el tratamiento de padecimientos, como: síndrome de estrés post-traumático, depresión e ideación suicida.

Cuando se trata del presunto agresor, también es esencial efectuar el examen psiquiátrico, para determinar su personalidad o cualquier alteración que influya en su comportamiento sexual, porque en algunas ocasiones se trata de un psicópata, alcohólico o farmacodependiente.

CASOS DE VIOLACIÓN EN MÉXICO

En México, las estadísticas al respecto son deficientes. La vergüenza de las víctimas y el temor a desencadenar represalias de parte del agresor, provoca que estos delitos con suma frecuencia no sean denunciados o incluso no sean reconocidos como tales por quienes los padecen o quienes los cometen. Aunque las denuncias han registrado un constante aumento a partir de la apertura de agencias especializadas para atender tales agresiones, se estima que sólo una de cada diez violaciones es denunciada ante la ley.⁵⁴

La violación constituye una de las expresiones más graves de violencia contra las mujeres. En el Distrito Federal, entre los hechos de esa naturaleza denunciados durante el primer semestre de 1995, alrededor del 54 por ciento corresponde a violaciones, 8 por ciento a intentos de violación, 33 por ciento a abusos sexuales y el 5 por ciento restante a estupro, hostigamiento y adulterio. Alrededor de la mitad de los casos de violación y otros delitos conexos son cometidos contra niñas y adolescentes; cerca del 26 por ciento corresponde a menores de 12 años de edad y 28 por ciento a adolescentes. Una investigación publicada en 1993 documentó en 33 fuentes oficiales y no gubernamentales cerca de 10 000 casos de abuso sexual cometidos entre enero de 1990 y julio de 1991, de los cuales entre 70 y 80 por ciento, correspondió a abuso sexual en menores. Las diversas fuentes disponibles confirman que la gran mayoría de los delitos sexuales denunciados son perpetrados por familiares o personas conocidas de las víctimas. Se advierte que el padre o el padrastro, como reiteradamente lo señala la literatura sobre el tema, son quienes cometen con mayor frecuencia este tipo de delitos, seguidos por abuelos, tíos y hermanos.⁵⁴

Algunos datos reportados en los informes de la Procuraduría General de la República indican que en la gran mayoría de los casos denunciados de violencia doméstica en el Distrito Federal, las víctimas son mujeres casadas o separadas y el agresor es el esposo o compañero. Alrededor de ocho de cada diez mujeres que fueron atendidas en el Centro de Atención a la Violencia Intrafamiliar durante el primer semestre de 1995 sufrieron la agresión de sus cónyuges. Con frecuencia se señala que tales datos son apenas leves indicios de la magnitud del problema, ya que un número desconocido de mujeres se abstiene de denunciar los actos de violencia de que son objeto.⁵⁵

Los niños y niñas constituyen el siguiente grupo en importancia dentro de las víctimas de la violencia doméstica, caso en el que los agresores más comunes son los propios progenitores. El hecho que las víctimas sean los miembros más indefensos de la familia hace pensar que los agresores usan la violencia para reafirmar una autoridad y una jerarquía que, por diversos motivos, pueden sentirse amenazadas, además de casos extremos y patológicos de abuso de autoridad.

La siguiente gráfica muestra únicamente el promedio de casos denunciados.

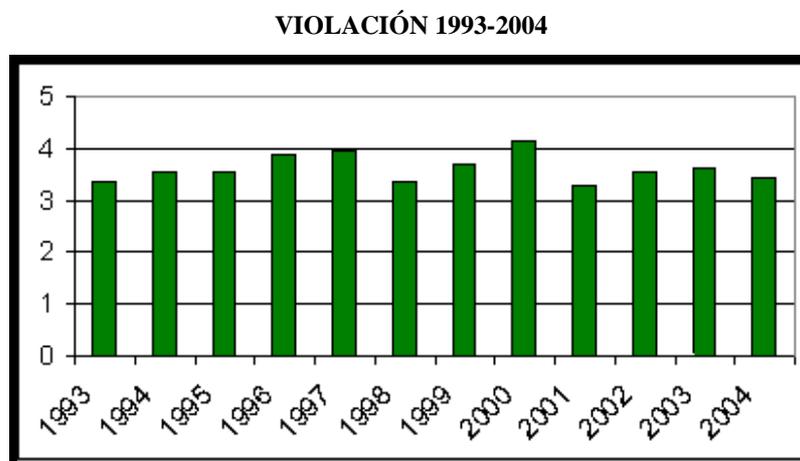


Figura 19. Promedio diario de violaciones en el DF. ⁵⁵

Tabla 4. Promedio y variación en los últimos 12 años en denuncias de violación. ⁵⁵

	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Julio 2004		
promedio diario	3.35	3.56	3.53	3.88	3.97	3.36	3.71	4.13	3.29	3.56	3.61	3.43		
variación %		6.27	-0.84	9.92	2.32	-	15.37	10.42	11.21	-	20.23	7.99	7.99	-4.94

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La demostración de una violación implica el estudio de las secreciones presentes en la víctima posterior al delito. La detección de algunos de los constituyentes del semen es de vital importancia principalmente si el individuo está inconsciente, es un menor de edad o se trata de un cadáver en estudio. Desafortunadamente, la sensibilidad para el análisis esta limitada sólo a aquellas muestras provenientes de casos en que el abuso sexual no exceda de 72 horas.

Para este análisis se determina la presencia de huellas de semen, que será apoyada con la determinación de fosfatasa ácida y la búsqueda de espermatozoides. Aquellos casos en los que no existe evidencia de espermatozoides originan un análisis incompleto. Hoy en día, en algunos lugares se está realizando la determinación del APE para complementar el estudio en estos casos. Es por ello que su implementación como prueba de rutina apoyaría a otras evidencias para que se tomen dictámenes correctos. Para esto será necesario evaluar su especificidad de acuerdo al método de análisis, así como su costo dentro de las ventajas y desventajas que este presente.

OBJETIVOS

- Demostrar la importancia y utilidad de la determinación de antígeno prostático en muestras de semen provenientes de víctimas de violación en los casos en que no hay presencia de espermatozoides.
- Establecer la especificidad del análisis en comparación a otras pruebas aplicadas a la investigación de delitos sexuales.
- Analizar el costo que puede tener la implementación de este estudio en los estudios de rutina.

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Los delitos sexuales lamentablemente son muy frecuentes en nuestra sociedad, en la mayor parte de éstos la víctima aún conserva indicios de una violación, tales como secreciones cuando no se ha bañado o no se ha deshecho de sus prendas, ya que estas secreciones ayudan a la identificación del agresor. Sin embargo, hay ocasiones en que no se encuentran espermatozoides y es difícil saber si realmente se trata de líquido seminal, es por ello que la determinación del antígeno prostático ayuda a tener dictámenes correctos.

Hay poca información sobre esta prueba, por lo que la investigación sobre la aplicación del APE, que ofrece resultados más veraces, permitirá implementarla como un análisis complementario en el laboratorio médico forense.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio será realizado bibliográficamente, sólo tratará la prueba desde el punto de vista comparativo a las pruebas ya establecidas y no será experimental.

METODOLOGÍA

- Se realizará investigación bibliográfica en libros relacionados al área Químico Forense, así como en libros de Bioquímica en general.
- Se realizará búsqueda de información en internet para contactar sitios de información como Institutos en otros países en donde se realiza investigación o en donde ya es utilizada esta prueba.
- Se apoyará la investigación en artículos publicados preferentemente a partir del año 2000 para tener la información más reciente y veraz.

ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

En México no existe la costumbre o la idea de llevar estadísticas sobre la información importante que ocurre en el país, como tal vez se lleva a cabo en otros lugares como en Estados Unidos. Es por ello que en cuanto a los casos de violación en México estos datos son deficientes. Esta ocurre principalmente sobre las mujeres aunque también los casos de abuso en niños y en hombres son comunes.

La violación es una expresión grave de violencia contra la mujer, que muchas veces ocurre por parte de un conocido o familiar. La vergüenza de las víctimas o el temor a represalias las hace que callen el delito, o simplemente el haber visto que al denunciar un delito no se aplicó justicia y consideran que no tiene caso estar horas esperando a que la denuncia sea tomada y que no se resuelva nada, además del trago amargo que resulta de realizarse los exámenes e interrogatorios en el Ministerio Público.

Aunque de algunos años a la fecha aumentaron el número de denuncias, desde 1993 el promedio de violaciones denunciadas en el Distrito Federal oscila de 3 a 4, lo cual se estima es el 30% de los casos totales. Es alarmante que esto ocurra en un país como México, y es necesario que los delitos de este tipo no queden impunes.

Si en un caso presuntivo de violación se tiene una muestra para su análisis, no se puede emitir un resultado con la mayor certeza de que esa evidencia sea semen, al menos con la metodología actual del laboratorio químico forense. El ofrecer como profesionista químico un resultado sin tener la total seguridad de si la muestra es o no semen es de gran importancia, ya que esto determina si una persona es culpable o inocente, y de serlo iría a la cárcel o sería culpado equivocadamente.

El líquido seminal es una mezcla de sustancias que son aprovechadas para su análisis, contienen dispersos a los espermatozoides, contiene proteínas como la p30 (APE) que es secretada por la próstata y es la encargada de licuar al semen después de la eyaculación. Aunque se conoce que prácticamente toda la proteína es llevada al semen, una parte se escapa al torrente sanguíneo y es otro de los lugares donde se puede encontrar aunque en pequeñas cantidades.

Aprovechando esta producción específica de la próstata es utilizado para el diagnóstico de cáncer prostático o para monitorear el tratamiento a este, ya que en su desarrollo se ve aumentada la producción y entonces también aumenta la concentración plasmática. En el laboratorio químico forense también se utiliza esta especificidad y es por lo tanto una herramienta importante para determinar si una muestra presuntiva es semen o no.

La idea del ser humano de identificar al semen se ha llevado a cabo desde hace mucho tiempo, desde que se observó al espermatozoide por primera vez en el siglo XVII, pasando por diversas técnicas o métodos, como lo son tratar muestras con yodo alcalino para formar cristales de colina, tratar las muestras con ácido pícrico para formar cristales de picrato de espermina, la radiación UV que mostraba fluorescencia azulada, entre otros. Los métodos anteriores resultan inespecíficos, ya que no muestran resultados concluyentes ni característicos.

Otros métodos utilizados como la detección de la fosfatasa ácida, sobre todo lo utiliza el laboratorio forense en México, pero tampoco es concluyente, ya que aunque la fosfatasa ácida esté presente en el semen en concentraciones altas, también se encuentra en otros sitios como legumbres, otros líquidos biológicos e inclusive en la vagina; por ello puede considerarse como una técnica de orientación.

En el laboratorio químico forense la única prueba confirmativa es entonces la búsqueda e identificación del espermatozoide. Si el químico encuentra en la muestra presuntiva a los espermatozoides ya no hay duda sobre ella. Pero aún con las diversas técnicas de tinción celulares en ocasiones es difícil su identificación.

Como se ha revisado en delitos sexuales las víctimas al momento de acudir al ministerio público, pasan por exámenes de exploración física, cuestionamientos y recreaciones, situación que es muy incómoda. Un punto importante en este paso, es que la gran mayoría de personas debido a la sensación desagradable después de sufrir la violación, se bañan o acuden a presentar su denuncia después de muchas horas.

Para un químico, al trabajar en el laboratorio, lo ideal sería obtener una muestra que fuera reciente y que al realizar el frotis se identificaran espermatozoides para no dejar lugar a dudas sobre la presencia de semen. Desafortunadamente esto no ocurre en la mayoría de los casos del laboratorio

químico forense, y aunque la obtención de muestra debe hacerse lo más rápido posible, la muestra no siempre es la ideal. Si el delito es denunciado ante el Ministerio Público (M.P) las muestras son tomadas en el laboratorio, buscando en el cuerpo de la víctima, o si va el servicio pericial al lugar del hecho, la búsqueda y toma de indicios puede hacerse de objetos del escenario, del cuerpo de la víctima, de la ropa tanto de la víctima como la del presunto agresor si la conserva.

Como es conocido ya las evidencias del caso investigado deben cumplir una serie de requerimientos de control para ser válidos y ser constatados por el M.P, esto es la cadena de custodia, que al realizarse correctamente no deja duda al momento de emitir resultados de que la muestra es auténtica y no permite que se rechacen los resultados por un mal manejo de las muestras.⁵⁵

Resumiendo entonces, el estudio químico forense de muestras presuntivas de semen lleva una serie de pruebas que van desde las técnicas presuntivas o de orientación hasta la prueba confirmativa. Los pasos a seguir serían los siguientes:

-La búsqueda de indicios pueden hacerse tomando muestras de lugares preferentemente en donde al aplicar luz UV se observe fluorescencia. En México el siguiente paso en los laboratorios químico forenses sería la prueba de fosfatasa ácida. En este momento podrían agregarse otras pruebas como la formación de cristales mencionados con anterioridad, aunque aumentarían datos sobre las características de la muestra, no dejarían de ser pruebas de orientación.

-Después de esto se observarían los frotis montados para la búsqueda de espermatozoides, y si se hallaran aquí concluiría el estudio. Sin embargo, ¿que ocurre para los casos en que no son encontrados los espermatozoides?. Sería válido presentar resultados que informen que no es semen la muestra analizada porque no se encontraron espermatozoides. Ésto porque se sabe que los espermatozoides son degradados por bacterias rápidamente, comenzando por la cola de este, lo que hace más difícil su identificación aunque estén presentes en la muestra, sobre todo en cadáveres. O la otra razón en la que la muestra aunque se trate de semen pueda no presentar espermatozoides debido a que provenga de un individuo vasectomizado, lo que provoca que no se encuentren espermatozoides en la evidencia.^{48, 49}

Éstos son algunos puntos importantes que aún en México no toman importancia y no permiten dar dictámenes certeros. Lo que se sugiere en estos casos es una prueba que ya se usa en otros países, como lo es la determinación de p30.

Las características de esta glicoproteína ya se han mencionado, no requiere la presencia del espermatozoide y puede determinarse por diversos métodos, siendo altamente confiable y proporcionando mayor validez al dictamen del laboratorio.

Como ya se ha visto, los métodos de elección para su determinación serían la precipitación por reacciones antígeno-anticuerpo, tanto la contraelectroforesis como la inmunoelectroforesis, siendo estas las más baratas para su utilización. La otra opción es la determinación mediante ensayos inmunoenzimáticos que es un poco más costosa, aunque el hecho de utilizar anticuerpos monoclonales para su determinación aumentan considerablemente su especificidad. Entonces lo ideal sería determinarlo por ELISA ya que ofrece mayor especificidad y sensibilidad detectando cantidades de hasta 0.0005 µg/mL.⁵⁰

Con esto puede considerarse la utilidad de complementar un análisis en el laboratorio químico forense para dar un mejor servicio a las leyes e impartir justicia con mayor confianza de ofrecer dictámenes correctos.

Tabla 5. Comparación de los métodos para detectar semen después de cierto tiempo⁵⁰

PRUEBA	Tiempo de evolución después de colocar el semen en la piel		
	6 HORAS	11 HORAS	28HORAS
Fluorescencia (Lámpara de Wood)	95% ERAN POSITIVAS	85% ERAN POSITIVAS	54% ERAN POSITIVAS
Fosfatasa ácida	100% ERAN POSITIVAS	95% ERAN POSITIVAS	73% ERAN POSITIVAS
Búsqueda de espermatozoides	100% ERAN POSITIVAS	85% ERAN POSITIVAS	45% ERAN POSITIVAS
p30 por Inmunoelectroforesis	95% ERAN POSITIVAS	64% ERAN POSITIVAS	36% ERAN POSITIVAS
p30 por ELISA	100% ERAN POSITIVAS	100% ERAN POSITIVAS	91% ERAN POSITIVAS

La tabla anterior muestra uno de los experimentos realizados para ver el porcentaje de resultados que seguían dando positivos después de aplicar semen en piel de 11 voluntarios, siendo la determinación de p30 por ELISA la más eficiente y la más adecuada ya que es específica en comparación con la fosfatasa ácida que aunque muestra que después de cierto tiempo sigue siendo alta su detección, no es específica.

Se realizó otro experimento con un número total de 65 muestras, para detectar el líquido seminal después de 28 horas y el resultado fue el siguiente:

Tabla 6. Muestras de semen evaluadas por diferentes técnicas⁵⁰

PRUEBA	% POSITIVO
Búsqueda de espermatozoides	72
Fosfatasa ácida	91
p30 por ELISA	97

Por lo que se tienen mejores resultados para determinar la presencia de semen aún en ausencia de espermatozoides.

La p30 tiene muchas ventajas que serían útiles para el químico analista, sin embargo, la limitante es que los laboratorios periciales no la justifican para no elevar los costos, ya que un laboratorio subsidiado por el gobierno no puede cubrirlo, sobre todo para tantos casos de violación. Considerando esto, lo que se podría hacer es implementarlo sólo en los casos en que no se encuentren espermatozoides y todas las pruebas de orientación hagan considerar que debe hacerse un estudio más profundo.

También podría pensarse que no es necesario determinar la p30 y realizar alguna prueba de patrón genético que sería más específico, aunque también más caro (1000-1200 pesos por prueba, BIO-RAD) pero sí es utilizado sólo en casos en los que la persona violada posee influencias sociales y presionan para que se les administre justicia, situación que lamentablemente ocurre en nuestra sociedad.

Por todo esto lo más adecuado es evaluar la posibilidad de usar la prueba de p30 y aunque se gaste dinero, saber que el estudio que se realiza en el laboratorio es lo mejor con lo que se cuenta hasta el momento.

CONCLUSIONES

- La determinación de antígeno prostático comparada a otras técnicas es muy útil como herramienta legal en el laboratorio químico forense.
- La determinación por medio de inmunoensayo enzimático es más sensible, eficaz y reproducible, aunque más cara por la utilización de anticuerpos monoclonales.
- Su determinación es necesaria para mayor validez de los resultados del laboratorio que concluyen a dar un dictamen certero.
- Debe implementarse en los laboratorios periciales como complemento al estudio, ya que es necesario para mejorar la impartición de justicia en el ámbito de delitos sexuales.
- El costo que implicaría implementar este estudio es elevado en comparación a las pruebas que hoy en día se realizan, siendo más de mil pesos en promedio una sola prueba, lo que según ciertos Químicos de la PGR no resulta adecuado debido a los recursos materiales que se les asigna por parte del gobierno.
- En los estudios comparativos se muestra que la determinación de p30 es muy sensible y puede dar resultados certeros después de tiempos prolongados en comparación a otras pruebas.
- Debe realizarse mayor investigación sobre estas pruebas, ya que la información es muy escasa y poco accesible.
- Se deja abierta la posibilidad de que se haga un estudio práctico para corroborar la eficacia de los métodos para determinar el antígeno prostático.

LISTA DE TABLAS

TABLA	Pág.
Características y composición del semen.....	8
Etapas de la producción de anticuerpos monoclonales.....	10
Comparación entre la sensibilidad de técnicas para detectar anticuerpos.....	12
Promedio y variación en los últimos 12 años en denuncias de violación.....	34
Comparación de los métodos para detectar semen después de cierto tiempo.....	40
Muestras de semen evaluadas por diferentes técnicas.....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
Aparato reproductor masculino.....	4
Flujo sanguíneo arterial en el pene.....	6
Imagen 3D del antígeno prostático.....	9
Esquema de producción de anticuerpos monoclonales.....	11
Esquema total de producción de anticuerpos monoclonales.....	11
Forma de realizar un frotis adecuado.....	14
Lámpara fluorescente.....	16
Toma de muestra para la determinación de fosfatasa ácida.....	18
Morfología del espermatozoide.....	19
Comparación entre espermatozoides vistos al microscopio y una imagen señalando sus partes.....	19
Migración de sustancias en la inmunoelectroforesis.....	21
Ejemplo de un corrimiento electroforético en gel.....	21
Bandas en una reacción antígeno-anticuerpo por contraelectroforesis.....	22
Placas para realizar ensayos de ELISA.....	23
Ejemplo de la coloración de una reacción positiva en ensayo de ELISA.....	23

ELISA en sándwich.....	24
ELISA indirecto.....	24
ELISA por competición.....	25
Promedio diario de violaciones en el Distrito Federal.....	34

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Lidner H. Anatomía clínica. Ed. Manual moderno; México, 1990: 509-512.
- 2) Fawcett D. Tratado de Histología. Ed. MacGraw-Hill, 12ª edición; Madrid, 1995: 835-873.
- 3) Miller A, Leavell C. Manual de Anatomía y Fisiología. Ediciones científicas la prensa médica mexicana, 2ª edición; México, 1979: 734-741.
- 4) Constanzo L. Fisiología. Ed. McGraw-Hill; México, 2000: 436-440.
- 5) Guyton A, Hall J. Fisiología y Fisiopatología. Ed. MacGraw-Hill, 6º edición; México, 1998: 640-643.
- 6) Ganong F. Fisiología Médica. Ed. Manual moderno, 17ª edición; México, 2000: 471-475.
- 7) Collins T, Kumar V. Patología estructural y funcional. Ed. MacGraw-Hill, 6ª edición; Madrid, 2000: 1077-1080.
- 8) Rojas O. Inmunología de memoria. Ed. Panamericana, 2ª edición; México, 2001: 157-165.
- 9) Todd S. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Salvat, 7ª edición; Barcelona, 1984: 703-710.
- 10) Kaplan. Química clínica. Ed. Panamerica; Buenos aires, 1986: 1273- 1276.
- 11) Anderson C. Química clínica. Ed. Interamericana; México, 1993.
- 12) Silbernagl S. Atlas de Fisiología. Ed. Científica PLM; México, 1985: 206-208.
- 13) Farreras P. Medicina Interna. Ed. Doyma, 12ª edición Vol. 1. ; Barcelona, 1992: 1708-1710.
- 14) Manual de laboratorio de la OMS para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Ed. Médica Panamericana, 4ª edición; Madrid, 2001: 5-40.
- 15) Franco de Ambriz M. Hematología Forense y otras técnicas de serología. Ed. Porrúa, 4ª edición; DF. , 2002: 103-130.
- 16) Grandini J. Medicina Forense. Distribuidora y Editora Mexicana; DF. , 1995: 82-89.

-
-
- 17) Joel A. Estudios sobre el esperma humano. Ed. Científico Médica; Madrid, 1959: 45-55, 124-129.
 - 18) García I. Procedimiento Pericial Médico-Forense. Normas que lo rigen y los Derechos Humanos. Ed. Porrúa; DF. , 2002: 102-117.
 - 19) Manual de Medicina Legal. Práctica Forense. Ed. Abeledo-Perrot, 3ª edición; Buenos Aires, 1980: 597-600.
 - 20) Alcaraz I. Elementos de Anatomía Humana. Méndez editores, 13ª edición; México, 2003: 105-117.
 - 21) Williams P. Anatomía de Gray. Harcourt. Tomo II, 38ª edición; Madrid, 2001: 1847-1859.
 - 22) Gartner L, Hiatt J. Texto Atlas de Histología. Mc Graw-Hill, 2ª edición; México, 2002: 463-483.
 - 23) Berne R, Levy M. Fisiología. Harcourt, 3ª edición; Madrid, 2002: 590-597.
 - 24) Rojas N. Medicina Legal. Abeledo-Perrot, 12ª edición; Buenos Aires, 1982: 166-172.
 - 25) Achavál A. Manual de Medicina Legal, Práctica Forense. Abeledo-Perrot, 3ª edición; Buenos aires, 1962: 527-540.
 - 26) Knight B. Medicina Forense de Simpson. Manual Moderno, 2ª edición; México, 1999: 159-168.
 - 27) Martínez M, Saldivar S. Medicina Legal. Méndez Editores, 16ª edición; México, 2000: 222-238.
 - 28) Alva M. Compendio de Medicina Forense. Méndez Editores, 2ª edición; México, 1999: 208-243.
 - 29) Pomerol M, Arredondo J. Práctica Andrológica. Ediciones Científicas y Técnicas S.A., Barcelona, 1994: 35-44.
 - 30) Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. Ed. Interamericana, 10ª edición; México, 2001: 480-485.
 - 31) Tietz N. Guía clínica de pruebas de laboratorio. Editorial Panamericana, Buenos aires, 1988: 418,450.
 - 32) Código Penal Federal. Ed. Raúl Ramírez Carro S.A. , México, 2003.

-
-
- 33) Day R. Como escribir y publicar artículos científicos. Organización Panamericana de la Salud, 2ª edición; Washington, 1996: 45-95.
 - 34) Potter, H. Analysis of Biological Molecules. Ed. Chapman & Hall, 5ª edición; London, 1995: 163-175.
 - 35) Stark M. A Physician's Guide to Clinical Forensic Medicine. Humana Press; Totowa, 2000: 211-243.
 - 36) Anderson W. Immunology. Fence Creek Publishing; Oxford, 1999: 182-184.
 - 37) Paul W. Fundamental Immunology. Raven Press; New York, 1989: 331-344.
 - 38) Meltzer S. Methods in Molecular Biology. Humana Press; New Jersey, 1997: 235-237.
 - 39) Hermanson G. Bioconjugate Techniques. Academic Press; San Diego, 1996: 461-463.
 - 40) Groleau G, Jackson M. Forensic Examination of victim and perpetrator of sexual assault. Lippincott Williams & Wilkins; New York, 2001: 85-102.
 - 41) Allery J, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological Detection of Spermatozoa: Comparison of Three Staining Methods. J Forensic Sci 2001; 46(2): 349-351.
 - 42) Kobus H, Phil D, Sileniaks E, Scharnberg J. Improving the effectiveness of Fluorescence for the detection of semen stains on fabrics. J Forensic Sci 2002; 47(4): 1-5.
 - 43) Chen J, Kobilinsky L, Wolosin D, Shaler R, Baum H. A physical method for separating spermatozoa from epithelial cells in sexual assault evidence. J Forensic Sci 1998; 43(1): 114-118.
 - 44) Shewale J, Sikka S, Schneida E, Sinha S. DNA profiling of azoospermic semen samples from vasectomized males by using Y-PLEX™6 amplification kit. J Forensic Sci 2003; 48 (1): 127-129.
 - 45) Sato I, Nakamura A, Ujiie K, Yukawa N, Nakajima Y. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for ABO blood typing of semen by using anti-p 84 monoclonal antibody as a marker of blood group substance in semen. J Forensic Sci 2000; 45 (4): 795-800.
 - 46) Sasaki M, Shiono H. ABO Genotyping of Suspects from Sperm DNA Isolated from Postcoital Samples in Sex Crimes. J Forensic Sci 1996; 41 (2): 275-278.

-
-
- 47) Chen JT, Hortin GL. Interferences with semen detection by an immunoassay for a seminal vesicle-specific antigen. J Forensic Sci 2000; 45 (1):234-235.
- 48) Hochmeister M, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, Dirnhofer R. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. J Forensic Sci 1999; 44 (5): 1057-1060.
- 49) Johnson ED, Kotowski TM. Detection of Prostate Specific Antigen by ELISA. J Forensic Sci 1993; 38 (2): 250-258.
- 50) CASTRO, D. Investigación en delitos sexuales. UNH; Honduras, 2004, Consulta 9 mayo 2004. <http://www.arrakis.es-jacoello-ids.pdf>
- 51) UCC, Medicina reproductiva. Colombia, 2004, consulta 15 julio 2004. <http://www.encolombia.com/medicina-reproductiva>.
- 52) SÁNCHEZ, JM. Curso de introducción a la Inmunología porcina. México, 2004, consulta 20 julio 2004. <http://www.revista-anaporc.com/curso/inicio.html>.
- 53) EU, 2004, consulta 10 julio 2004. <http://www.emedicine.com/>
- 54) México, 2004, consulta 15 agosto 2004. <http://www.unam.mx/rompan/27/rf27auto.html>
- 55) México, 2004, consulta 15 agosto 2004. <http://www.pgr.gob.mx>.
- 55) Colombia, consulta 20 agosto 2004. <http://www.matematicas.udea.edu.co>
- 56) USA, consulta 25 enero 2004. <http://www.proteindatabank/>