



*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO*

*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA*

*ESTUDIO DE MANCHAS DE SEMEN EN LA
INVESTIGACION DE DELITOS SEXUALES*

TESIS

QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

BLANCA EDITH ROMERO RENTERIA

MÉXICO D.F. ENERO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

A MI MAMI: La Sra. Blanca Estela Renteria Rodríguez, por su ejemplo, apoyo y amor; por mostrarme la fuerza y coraje para vivir, enseñarme a trabajar por lo que quiero y sobre todo por quienes quiero, por quitar de mi diccionario la palabra no se puede.

A MI PAPI: El Sr. Antonio Romero Ramírez, por su ejemplo, apoyo y amor; por mostrarme todos los días las cosas importantes, darme paz y seguridad, por enseñarme que no importa a donde vaya siempre recuerde de donde vengo, para poder volver.

A MIS HERMANOS: Noelia Fca., Antonio de Jesús y Clarisa Jareth (con todo y la Isis). Por ser mis cómplices, mis apoyos y la fuente de inspiración para luchar por mis sueños. Por que me hacen querer ser mejor persona. Por que todos los días luchan a mi lado, codo a codo, por mantener nuestra casa y sobre todo por que a pesar de mis muchos defectos me aman sin condiciones.

AGRADECIMIENTOS

A mi tía Rosario y su familia, a Jorge y su familia, a mi tía Martha, a mi asesor y director de tesis Maestro Ángel García, a mis profesores (y verdugos), a mis amigos (y compañeros de sufrimiento), a todas las personas que de forma directa o indirecta contribuyeron a la realización de un sueño que hoy se transforma en realidad.

INDICE

Resumen	3
Justificación.....	4
Introducción	5
Marco teórico.....	7
1. Aparato Reproductor Masculino.....	12
1.1. Testículos y epidídimo.....	14
1.2. Conductos genitales.....	17
1.3. Glándulas accesorias.....	18
1.4. Pene.....	21
2. Acto sexual masculino.....	25
2.1. Etapas del acto sexual masculino.....	26
2.2. Semen.....	28
2.3. Espermatogénesis.....	32
2.4. Espermatozoide.....	32
3. Delitos sexuales.....	37
3.1. Tipos de coito y lesiones.....	45
3.2. Peritación médica. Víctima.....	51
3.3. Examen del acusado.....	59
3.4. Examen del escenario.....	63
4. Legislación vigente a Julio de 2003.....	64
5. Estudio legal de manchas y huellas de semen.....	74
5.1. Recolección de muestras.....	76
5.2. Manchas de semen.....	80
5.3. Examen microscópico de la muestra.....	81
5.4. Diagnóstico genérico de la muestra.....	83

5.4.1.Pruebas de orientación	
Cristalografía.....	83
Por luz Ultra-Violeta.....	85
5.4.2.Pruebas de presunción	
Técnica de la Fosfatasa Ácida.....	86
5.4.3.Pruebas de certeza	95
Técnicas de tinción para espermatozoides.....	99
5.5.Diagnóstico individual de la mancha de esperma.....	107
5.5.1.Determinación del grupo del sistema ABO.....	107
6. Estudio del material genético en muestras provenientes de delitos sexuales	
6.1.Introducción.....	111
6.2.Contaminación biológica.....	113
6.3.Degradación.....	115
6.4.Muestras procedentes de agresiones sexuales.....	117
6.4.1.Extracción diferencial de DNA a partir de muestras combinadas.....	123
6.4.2.Extracción orgánica y separación de DNA de células espermáticas y vaginales.....	124
6.4.3.Extracción diferencial de DNA espermático.....	126
6.5.Métodos de análisis de DNA utilizados en México (1990 – 2003)	129
6.6.Etapas de las pruebas de DNA en el Laboratorio de Biología Forense.....	140
6.7.Recomendaciones básicas para el control de contaminación.....	142
Conclusiones.....	146
Bibliografía.....	147

RESUMEN

Se realizó un estudio documental para lograr la compilación y organización de la información referente a la investigación de las manchas de semen implicadas en delitos sexuales, haciendo asequible la consulta. Se dan a conocer los procedimientos que se siguen en una secuencia para el estudio de las manchas de semen que se investigan en los diferentes procesos legales de índole sexual, para una mejor y mayor comprensión de los hechos relacionados a la comisión del delito. Por lo cual se habla de anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino, características del semen, clasificación, aspectos e implicaciones legales de los delitos de índole sexual, así como, de técnicas de identificación específicas e inespecíficas, de género, especie y para obtención de ADN, a partir de las manchas de semen.

JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE

La impartición de justicia en los delitos de índole sexual, en especial la violación, por su naturaleza y consecuencias a la persona y la sociedad, requiere de herramientas (conocimientos y técnicas) cada día más avanzadas, para auxiliarse en la tipificación del delito, identificación de culpables o exclusión de inocentes. Para la investigación legal es de suma importancia la identificación rápida de manchas de semen, así como, las pruebas específicas de especie, género y las relacionadas a la obtención de ADN, que en ellas pueden realizarse.

La importancia de desarrollar pruebas (determinaciones) confiables y rápidas en una investigación legal, hace necesaria la continua modernización de las técnicas y métodos existentes para llevarla a cabo, ya que en muchos casos, de los resultados de tales estudios depende probar o descartar la participación de una persona en un hecho delictivo

En teoría existen procedimientos para el manejo de las manchas o muestras de semen que nos dan una buena confiabilidad en sus resultados, pero lo cierto es que en el área forense el estado de las muestras por lo general no es el ideal, llegando incluso a dificultar o invalidar estos resultados.

El presente, resultado de un estudio documental, es una compilación y organización de información referente a la investigación de las manchas de semen implicadas en delitos sexuales y proporciona información detallada para llevar a cabo la secuencia que debe desarrollarse en las manchas de semen, con la finalidad de proporcionar una herramienta útil para la consulta rápida sobre el tema.

INTRODUCCIÓN

El estudio y seguimiento de las demandas de ataques sexuales, en especial su legitimidad, involucra un aspecto en extremo difícil, con fuertes rasgos emotivos, sociales y feministas. El hecho es que una proporción significativa de las demandas de violación y ataques indecentes notificados a la policía son falsos, esto probado por varias admisiones subsecuentes de las presuntas víctimas de que no se produjo el ataque.

Sin embargo, contra esta afirmación se encuentra el hecho, por igual cierto, de que solo una minoría de los ataques sexuales reales se informan a las autoridades. Aunque es difícil obtener estadísticas, por la naturaleza de estos delitos, algunos estudios en EUA sugieren que menos de una quinta parte de los ataques sexuales son investigados por la policía.

Esta negación a realizar la denuncia se debe principalmente a que las víctimas o sus familiares saben que se expondrán al trato "indigno" de la interrogación, del examen médico, la comparecencia en tribunales, el probable ataque a su carácter y forma de vida por parte de la defensa, además de hacer públicos aspectos que se consideran estrictamente privados o vergonzosos para la persona o su familia.

Muchas de las víctimas no están convencidas de reportar estos asaltos sexuales por falta de confianza en que la acción legal lleve a la impartición de justicia y castigo del culpable; esto es justificable si tomamos en cuenta que solo en una fracción de las denuncias se llega a detener al presunto perpetrador y de estos solo una pequeña parte son declarados culpables y encarcelados.

El efecto de la violación se entiende mejor cuando se considera un delito contra la persona y no meramente un encuentro sexual. El trauma provocado por este delito, además de sus consecuencias físicas inmediatas (golpes, mutilaciones, infecciones de transmisión sexual, embarazo, etc.), puede tener consecuencias a largo plazo que comprometen el desarrollo sexual, social y personal de la víctima, cuando no le causan la muerte.

Dentro de los procesos legales, en ocasiones, la única forma de asegurar que ha existido copula es la presencia de semen en la vagina, del mismo modo este puede encontrarse sobre la piel o ropas de la víctima, ano, boca y/o diversas superficies en el lugar de los hechos, en forma de manchas húmedas o secas. De ahí la importancia de determinar si un indicio es o no semen.

Entre las manchas que interesan para el perito se encuentran las de sangre, semen, meconio, heces y orina, entre otras. Desde hace mucho tiempo se han tratado de estudiar con particular empeño los caracteres físicos y las reacciones químicas que pueden proporcionar las diversas clases de manchas, para su identificación y para poner a los peritos en condiciones de satisfacer las preguntas que les hicieran sobre el particular los jueces. En el pasado, estos conocimientos estaban lejos de satisfacer estas preguntas.

En el presente trabajo se abordarán las investigaciones que correspondan específicamente a semen o espermatozoides con la finalidad de hacer una compilación documental que permita conocer los procedimientos de estudio de las manchas de semen, así como los aspectos legales involucrados en este tipo de casos.

Estos estudios, así como, los relacionados a la inmunología, la genética, la historia y evolución de las leyes, nos permiten conocer la importancia de los avances y alcances que la investigación forense implica, en especial en la identificación de las manchas de semen y la recuperación, a partir de estas, de una muestra de ADN para su posterior confrontación con la obtenida del presunto responsable del delito.

MARCO TEORICO

Para poder escribir con exactitud y objetividad sobre la violación y otras formas de violencia, es importante entender la naturaleza del delito, los medios de comunicación han perpetuado el mito de la violación como algo relacionado con la atracción sexual, un delito debido al deseo irreprimible de un desconocido, sin embargo hay estudios que demuestran que la mayoría de los violadores conocen a sus víctimas, y que, en vez de ser personas solitarias e incapaces de llevar una vida normal, están casados o tienen una compañera sexual habitual⁵¹.

La policía calcula que solo una de cada 35 violaciones es denunciada. En 1996 menos de la mitad de todos los casos de violación notificados pasaron a los tribunales y menos del 10 % de estos resultaron en fallos condenatorios⁵².

De acuerdo al Uniform Crime Report de 1997, aproximadamente 350,000 mujeres reportaron ataques sexuales en ese año en los EUA. En 1998 el instituto nacional de justicia y el centro de control de desordenes en mujeres víctimas de violencia en la nación, documentó un estimado de 302,100 mujeres y 92,700 hombres que fueron atacados ese año en EUA. Sin embargo las estadísticas están por debajo del número de víctimas de asalto sexual por año.

En 1993 el Senado Judicial de EUA reportó que el 84% de las denuncias no resultaron en la detención del presunto culpable, del 16% restante donde si hubo detenido, solo la mitad fue sentenciado por más de 1 año de prisión y el 4% nunca fue encarcelado¹.

La violación y el coito forzado se utilizan como arma contra la mujer en situaciones bélicas en todo el mundo. Las mujeres que huyen de la guerra con frecuencia se enfrentan a mayor violencia sexual durante su huida, mientras buscan condiciones de seguridad y sustento para sí mismas y sus familias⁵³.

Desde hace algunos años se han realizado estudios que relacionan los delitos de índole sexual y sus consecuencias a la persona y la sociedad.

Burges y Holmstrom han definido un síndrome específico del trauma de la violación. Lo dividen en dos etapas: una inmediata o de respuesta aguda, en la cual el estilo de vida de la víctima es alterado por la agresión, y un proceso de largo plazo en el cual la víctima se reorganiza.

La respuesta aguda, a su vez, la subdividen en dos tipos: "el estado expresado" en que la víctima está perturbada emocionalmente de modo visible, en contraste con "el estilo controlado" en el que aparece tranquila a los ojos del observador casual².

Algunas de las consecuencias tardías son las siguientes:

1. Desconfianza hacia las personas. Se evita o se titubea para relacionarse con ellas.
2. A menudo se presenta una variedad de trastornos sexuales, como disfunción sexual y conflictos maritales.
3. Reacciones fóbicas persistentes.
4. Ansiedad y depresión que pueden ser precipitadas por eventos en apariencia no relacionados que de alguna manera pueden revivir el trauma original.
5. Ansiedad persistente y rechazo a exámenes o procedimientos ginecológicos.
6. Suicidio o intentos suicidas.

Esto hace necesario un seguimiento psiquiátrico durante uno o dos años, por lo menos. La víctima puede manifestar síntomas de larga duración, y aun el desarrollo de neurosis traumática que requiere tratamiento prolongado³.

La violencia sexual también puede producir otros efectos deletéreos sobre la salud y el bienestar de las mujeres. La violencia sexual aumenta el riesgo de las mujeres de contraer enfermedades de transmisión sexual, entre ellas el sida, ya sea a través de relaciones sexuales forzadas o porque difícilmente pueden obligar a los hombres a usar condón⁵⁴.

Todas estas consecuencias a la persona y por reflejo a la sociedad, hacen necesario la prevención del delito y una de las formas más efectivas para lograr esto es aplicando sentencias severas, pero para llegar a estas, la investigación debe aportar evidencias basadas en las muestras e indicios relacionadas al caso, por ejemplo, pelos, fibras y manchas.

Por mancha se entiende toda modificación de color, suciedad o adición de una materia extraña, que visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto cualquiera, determinada por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo.

En medicina forense, la investigación de las manchas es de gran valor, sin embargo, nos enfrentamos a un grave problema en esta área: el médico forense no cuenta con los conocimientos suficientes de química, ni con el instrumental de laboratorio necesario para efectuarla, por esta razón, siempre tiene que recurrir al auxilio del laboratorio para poder realizarla⁴.

Las manchas que se investigan son las siguientes: calostro, leche materna, meconio, semen, sangre, líquido amniótico, unto sebáceo, materias fecales y orina.

En las manchas de esperma el examen ideal se realiza con esperma fresco y se considera fresca toda mancha que mantiene sus condiciones organolépticas. Sin embargo, casi siempre el examen se realiza en forma tardía, sea por retardo en la instrucción, por retraso en el hallazgo de la víctima o imputable al retardo con que se logran las pruebas. Una dificultad, casi siempre a superar, y que obliga a métodos adecuados, es el examen de manchas sucias o lavadas.

Las manchas de esperma solo indican una cosa, eyaculación, espermatorrea o "escurrimiento" seminal, pero nunca podrán indicar por si, si se trata de violación, abuso deshonesto o cópula, caricias, perdidas seminales, que integran un acto consentido ⁵.

Por otra parte son motivo de estudio de esperma en muestras, el diagnostico de esterilidad, de enfermedades sexuales o endocrinas, la búsqueda de aglutinógenos especiales con la finalidad de investigar la paternidad, la prueba de identificación o testigo, de la mancha comparada, con el supuesto violador o acusado de otros delitos sexuales ⁶.

La importancia de encontrar semen en la escena de un crimen es doble. En primer lugar, el encontrar semen en determinados lugares pueden cambiar la tipificación de un delito o bien hacer que aparezca un nuevo delito que antes no se consideraba. En segundo lugar dado que el numero de espermatozoides por mililitro de semen es aproximadamente de 100 millones, por muy pequeña que sea la mancha, por diluida que este, aunque sean manchas de limpieza, siempre será posible encontrar espermatozoides en numero suficiente como para poder intentar amplificar el Ácido Desoxirribonucleico (DNA) con técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ⁷.

Existen trabajos notables que dan una base científica a esta clase de estudios y a los conocimientos necesarios para llevarlos a cabo, como los realizados por Mann en 1964 y Stauton en 1969, complementados por Vick en 1987 sobre líquido espermático. También se encuentran los trabajos realizados en 1970 por Villanueva en la composición cualitativa y cuantitativa de los elementos bioquímicos, antigénicos, enzimáticos, lípidos y minerales. Además estudios sobre Técnicas para observación de espermatozoides realizados por Pellisier y Cordoniev, Perez Villamil y Fuster, Vaechi, Derbieux, Muller, Bernardi, Berheim, en el periodo comprendido entre 1960 y 1990 ⁴.

La investigación de los componentes específicos del semen se inicia con los trabajos de Kutscher y Wolberg, que en 1935, ponen de manifiesto la alta concentración de fosfatasa ácida en la próstata. Lundquist en 1945, considerando que el líquido seminal esta constituido en gran parte por líquido prostático propone la determinación de la actividad fosfatásica del semen como test para la identificación de manchas de esperma. Hansen (1946), Rusfelt (1946) y

Rasmussen (1945) aplican el test de la fosfatasa ácida al diagnóstico médico legal de las manchas de esperma y Kind (1946) pone a punto una técnica de rutina para ser utilizada en medicina legal ⁴.

El esperma consta de dos elementos distintos: las células o espermatozoides, que proceden de los tubos seminíferos del testículo, y el plasma seminal, que procede del epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas de Cowper.

Para efecto de investigación legal, se realiza el estudio de las manchas de semen que abarca lo siguiente:

El examen macroscópico que incluye regiones del hallazgo, aspecto de la mancha con luz natural o artificial común, aspectos de la mancha con luz ultravioleta, palpación de las manchas, cantidad u olor.

El examen microscópico en investigación de espermios de forma directa o después de la elusión de la mancha, por métodos de tinción o instrumentales.

El examen químico que involucra pruebas no específicas como la reacción de Barberio y la reacción de Florense, y pruebas específicas como la investigación de fosfatasa ácida, electroforesis, diagnóstico individual y de especie.

Además de las técnicas de recuperación de células para obtención y posterior amplificación de ADN para su estudio y comparación.

1. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

Al hablar de violación, se debe entender como un delito que trae daños físicos inmediatos y a largo plazo, como son los de tipo social, psicológico y personal, o en el peor de los casos la muerte. En algunas ocasiones la única forma de corroborar que ha existido copula es con la presencia de semen en la víctima, presente en forma de mancha húmeda o seca.

Es necesario conocer el origen del fluido biológico que contiene la muestra (semen), que es además el órgano copulador por excelencia: el aparato reproductor masculino (ver figura 1).

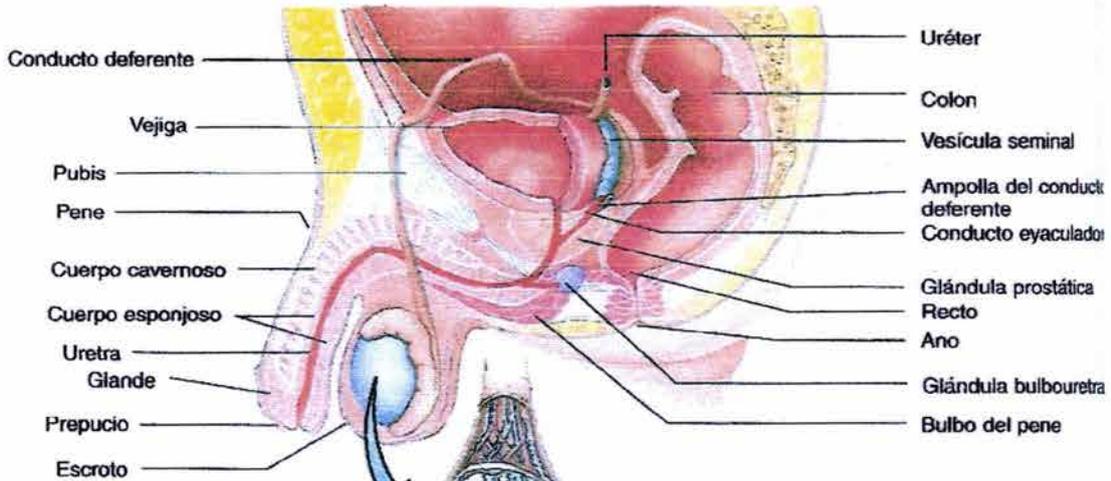
El aparato reproductor masculino consta de dos testículos (las gónadas masculinas) un sistema de conductos genitales, las glándulas accesorias y el pene. Interviene en la formación de los espermatozoides, la elaboración de las hormonas sexuales masculinas y la liberación de gametos masculinos en el tracto genital femenino¹⁵.

Las funciones reproductoras del varón pueden dividirse en tres partes principales: en primer lugar, la espermatogénesis (ver figura 1), que significa simplemente formación de esperma, en segundo lugar, la ejecución del acto sexual, y en tercer lugar, la regulación de las funciones sexuales masculinas por las diversas hormonas. Acompañando a estas funciones reproductoras están los efectos que tienen las hormonas sexuales masculinas sobre los órganos sexuales accesorios, el metabolismo celular, el crecimiento y otras funciones corporales¹⁶.

Los espermatozoides, los cuales se forman en los testículos, son los componentes esenciales del semen. Pasan del testículo al epidídimo, donde son almacenados. Una secreción mucosa procedente del epidídimo forma uno de los componentes del semen. Después de su emisión desde el epidídimo, los espermatozoides pasan por el conducto deferente y el conducto eyaculatorio hacia la uretra, a través de la cual llegan al exterior. Los componentes restantes del semen se producen en las vesículas seminales, la próstata, las glándulas de Cowper (bulbouretrales) y las glándulas uretrales. Las secreciones de estas estructuras, las cuales algunas veces se denominan órganos genitales accesorios glandulares, desembocan en la uretra¹⁷.

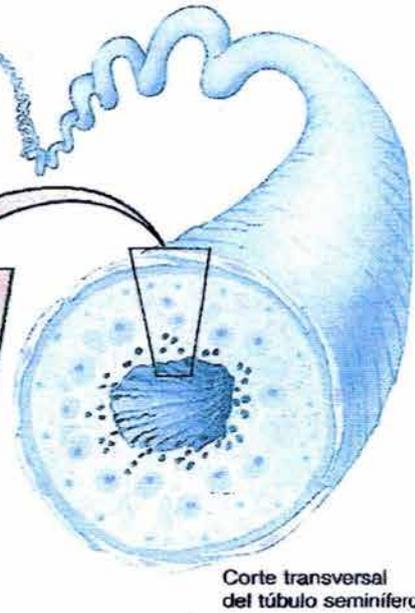
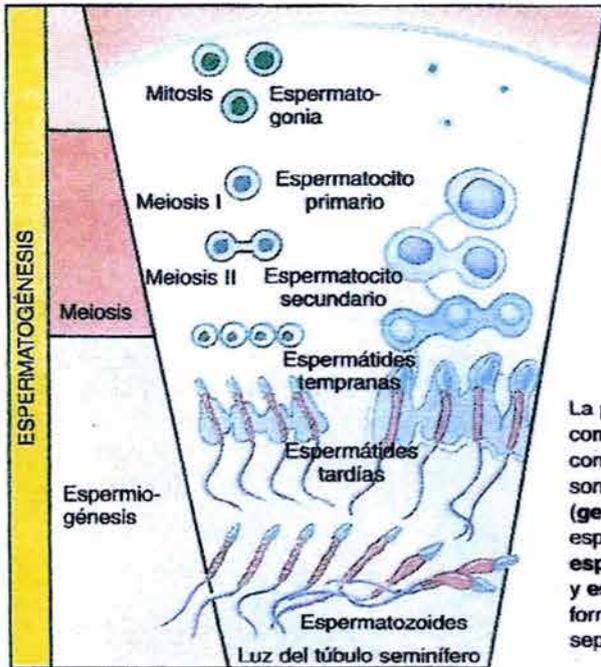
Figura 1

Aparato Reproductor Masculino y Espermatogénesis



Cada testículo está subdividido en aproximadamente 250 **lobulillos testiculares**, que contienen 1-4 **túbulos seminíferos** muy contorneados.

Testículo
Epidídimo



Corte transversal del túbulo seminífero

La pared de los túbulos seminíferos se compone de delgados elementos de tejido conectivo, cuyos principales componentes son **fibroblastos**. El **epitelio seminífero (germinativo)** consiste en células espermato-génicas y de Sertoli. Las **células espermato-génicas** sufren **mitosis, meiosis y espermio-génesis**. Las **células de Sertoli** forman zonas de oclusión entre sí, por lo que separan la luz del túbulo seminífero en dos

1. 1. TESTÍCULOS Y EPIDÍDIMO

Testículos.

Se encuentran en el escroto, donde el izquierdo generalmente está a un nivel inferior que el derecho. El derecho es más bajo que el izquierdo en casos de situs inversus totalis y generalmente es más bajo que el izquierdo en los zurdos. En el adulto, cada testículo pesa, en promedio, 25 g en la mayor parte de los casos el derecho es más pesado que el izquierdo.

Cada testículo tiene dos extremos, uno superior y uno inferior, caras interna y externa, y bordes anterior y posterior. Ambas caras son algo aplanadas. El borde posterior está cubierto por el epidídimo y la porción inferior del cordón espermático¹⁷. Cada uno es una estructura oval ubicada en un compartimiento separado dentro del escroto, cuya cápsula de tejido conectivo fibromuscular, o túnica albugínea, está engrosada en el mediastino testicular, del cual derivan tabiques que subdividen el testículo con unos 250 pequeños compartimientos incompletos, los lobulillos testiculares¹⁵.

Cada lobulillo contiene entre uno y cuatro túbulos seminíferos muy tortuosos que intervienen en la producción de espermatozoides. La luz de cada túbulo seminífero está revestida por un epitelio seminífero de varias capas de espesor. Las células basales de este epitelio se componen de células de Sertoli y espermatogonias. Estas últimas células se dividen por mitosis, por lo que se replican y producen espermatocitos primarios. Estos espermatocitos primarios diploides ingresan en la primera división meiótica para formar espermatocitos secundarios que, al completar la segunda división meiótica, dan origen a las espermátides haploides. Después de eliminar gran parte de su citoplasma, reorganizar la población de organelas y adquirir determinadas organelas especializadas, las espermátides se transforman en espermatozoides, los gametos masculinos.

Además de elementos vasculares y nerviosos, el tejido conectivo que rodea los túbulos seminíferos contiene pequeños cúmulos de células endocrinas productoras de andrógenos, las células intersticiales de Leydig. Estas células producen la hormona sexual masculina testosterona. Antes de la pubertad, no se produce testosterona, pero al comenzar esta, la glándula hipófisis libera hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). La primera activa las células intersticiales de Leydig, que liberan testosterona, mientras que la FSH induce a las células de Leydig a producir adenilciclase que, a través de un intermediario de adenil metil fosfato cíclico (AMPc), estimula la producción de proteína fijadora de andrógenos (ABP). La testosterona se fija a la ABP, y el

complejo es liberado a la luz de los túbulos seminíferos, donde la concentración elevada de testosterona estimula la espermatogénesis¹⁵.

Los testículos están cubiertos por una bolsa de piel o escroto que es común a los dos testículos. Es fina, muy extensible, pigmentada, marcada por pliegues transversales, interrumpida por un surco mediano longitudinal. En el adulto tiene pelos con glándulas sebáceas y sudoríparas⁴.

El escroto o bolsa testicular es la bolsa situada por detrás del pene y por debajo de la sínfisis del pubis. Se divide en dos compartimientos, cada uno de los cuales contiene un testículo, un epidídimo y la porción inferior del cordón espermático con sus envolturas. Por lo general, el compartimiento izquierdo cuelga un poco más abajo que el derecho¹⁷.

Epidídimo

Es una estructura en forma de C aplicada al borde posterior del testículo y recubre la porción adyacente de la cara externa. Los espermatozoides son almacenados en él hasta que son expulsados. Está subdividido en tres partes: una cabeza, un cuerpo y una cola.

Los conductillos eferentes del testículo, que en el inicio son rectos, llegan a ser muy tortuosos después de que penetran en la cabeza del epidídimo. Aquí forman masas en forma de cuña: los lobulillos (o Conos) del epidídimo, cuyos vértices se dirigen hacia el testículo. Después de un trayecto tortuoso, cada conductillo se abre en dirección opuesta a la base de un lobulillo hacia un solo tubo, el conducto del epidídimo. Este conducto que está muy contorneado y forma la masa principal del resto del epidídimo mide unos 6 m de largo.

La cabeza del epidídimo es la parte superior grande la cual se encuentra sobre el extremo superior del testículo y pende de él. El cuerpo del epidídimo está adherido al borde posterior del testículo y separado de la porción adyacente de la cara externa por el seno del epidídimo, un espacio formado por invaginación de la capa visceral de la túnica vaginal en esta región. La cola del epidídimo es la parte más pequeña y más inferior. En ella el conducto del epidídimo aumenta en grosor y diámetro, y llega a ser el conducto deferente¹⁷.

Constitución anatómica.

El testículo y el epidídimo comprenden una envoltura fibrosa, también llamada túnica albugínea, un tejido propio y túbulos seminíferos¹⁸.

A. Cápsula (Túnica albugínea).

La túnica albugínea es una membrana fibrosa, gruesa, sobre todo en la parte posterosuperior del testículo, donde forma el mediastino del testículo [cuerpo de Highmore] que encierra numerosas vasos y una red de conductillos eferentes, la red del testículo [Haller]. Envía septos que limitan los lóbulos del testículo. Estos lóbulos están recorridos por los túbulos seminíferos [canalículos espermáticos] que unen el testículo al epidídimo¹⁸. La cápsula está engrosada en el mediastino testicular, del cual emanan tabiques que subdividen el testículo en aproximadamente 250 lobulillos testiculares incompletos cada uno de los cuales contiene 1-4 túbulos seminíferos incluidos en una estroma de tejido conectivo¹⁵.

B. Tejido propio.

Comprende células espermatogénicas que originan los espermatozoides y células intersticiales que son el origen de la secreción interna de la glándula¹⁸.

C. Túbulos seminíferos

Transcurren en el testículo y desembocan en el epidídimo por los ductos aferentes del testículo [conos eferentes]. Éstos constituyen, en el epidídimo, un conducto que lo recorre de la cabeza hacia la cola donde se origina el conducto deferente¹⁸. Cada tubo seminífero muy contorneado se compone de una túnica propia fibromuscular separada del epitelio seminífero por una membrana basal.

Epitelio seminífero

El epitelio seminífero se compone de células de Sertoli sustentaculares y una capa estratificada de gametos masculinos en desarrollo. Las células de Sertoli establecen una barrera hematotesticular al formar uniones de oclusión entre sí, por lo que subdividen el tubo seminífero en los compartimientos adluminal y basal. El compartimiento basal contiene las espermatogonias A (claras y oscuras), las espermatogonias B y las caras basales de las células de Sertoli. El compartimiento adluminal contiene las porciones apicales de las células de Sertoli, los espermatoцитos primarios, los espermatoцитos secundarios las espermátides y los espermatozoides.

D. Relaciones

El testículo y el epidídimo están situados dentro de las bolsas, situadas debajo del pene y del perineo, entre los dos muslos. Esta situación es el resultado de una migración del testículo en el curso de la vida intrauterina¹⁵.

1.2. CONDUCTOS GENITALES

Es un sistema de conductos que transporta los espermatozoides y los componentes líquidos del semen hacia el exterior. Los túbulos seminíferos están conectados mediante cortos túbulos rectos a la rete testis; los túbulos rectos se encuentran revestidos por células símil Sertoli y por epitelio cúbico simple; la rete testis, esta compuesta de espacios laberínticos revestidos por células cúbicas dentro del mediastino testicular, desde allí los espermatozoides ingresan en la primer parte del epidídimo

Los espermatozoides maduran durante su permanencia en el epidídimo, la cabeza del epidídimo se compone de los conductillos eferentes, cuya luz está revestida por epitelio de tipo seudo estratificado, compuesto por células basales cortas y principales altas que poseen microvellosidades largas, mientras que el cuerpo y la cola conforman su conducto, cuya luz está revestida por epitelio cilíndrico simple, (altas ciliadas y no ciliadas bajas) las paredes de lo conductillos consisten en tejido conectivo fibroelástico y células musculares lisas, que se continúan en el conducto deferente, esta gruesa estructura muscular atraviesa el conducto original como parte del cordón espermático e ingresa en la cavidad abdominal, justo antes de llegar a la glándula prostática la vesícula seminal vacía sus secreciones en el conducto deferente que finaliza en este punto. El revestimiento mucoso de su luz pequeña está compuesto por epitelio seudo estratificado con estereocilias, asentado sobre una delgada lámina propia fibroelástica. La gruesa cubierta muscular se compone de tres capas de músculo liso: una capa longitudinal interna y una externa y una capa circular media

La vía se continúa en el conducto eyaculador que ingresa en la glándula prostática, esta glándula vierte su producto de secreción en ese conducto. Los conductos eyaculadores izquierdo y derecho desembocan en la uretra que transporta la orina y el semen hacia el exterior. La uretra atraviesa toda la longitud del pene y presenta tres regiones: las porciones prostática, membranosa y cavernosa (esponjosa)¹⁵.

CONDUCTO EYACULADOR

Formado por la reunión en ángulo agudo de la vesícula seminal con el deferente, se dirige oblicuamente hacia abajo, adelante y medialmente, en el espesor de la próstata. Después de un trayecto de 15 a 20 mm en el adulto, desemboca en la pared posterior de la uretra prostática a la derecha y a la izquierda del utrículo prostático y la pared uretral en la cual descargan los conductillos prostáticos. En la próstata, los dos conductos eyaculadores están situados en un espacio común en contacto el uno con el otro, separándose

adelante para dar paso al utrículo prostático que los separa. El conducto está constituido por una pared muscular lisa, tapizada por una mucosa. Toma sus vasos y sus nervios de las redes prostáticas¹⁸.

1.3. GLANDULAS ACCESORIAS

Las tres glándulas accesorias del aparato reproductor masculino que proveen los componentes líquidos del semen, son las dos vesículas seminales, un par de pequeñas glándulas bulbouretrales que vacían sus secreciones viscosas en la uretra cavernosa (esponjosa) y la glándula prostática.

Cada vesícula seminal es una larga glándula estrecha muy replegada sobre si misma. Produce una espesa sustancia nutritiva de color amarillo característico. La glándula prostática se compone de numerosas glándulas individuales que rodean la pared de la uretra cuyos conductos la perforan. Estas glándulas se distribuyen en tres regiones de la próstata por lo que se denominan glándulas prostáticas mucosas, submucosas y externa (principal), La secreción de la glándula prostática es un líquido fino blanquecino que contiene enzimas proteolíticas y fosfatasa ácida¹⁵.

A. VESICULAS SEMINALES

Son dos pequeños reservorios bilaterales situados detrás de la vejiga y adelante del recto. Cada una de ellas está dirigida de atrás hacia adelante, de lateral hacia medial y de arriba hacia abajo.

La vesícula seminal es alargada, piriforme, con una extremidad superior ensanchada y una extremidad inferior o cuello que se une con el deferente para formar el conducto eyaculador. Vista en un corte parece constituida por varias cavidades que comunican entre sí y le dan un aspecto abollonado. Su pared está constituida por músculo liso, tapizado por una mucosa cuyas células segregan un producto viscoso que participa en la constitución del esperma¹⁸.

Las vesículas seminales son dos saculaciones que producen gran parte del semen. Cada vesícula mide unos 5 cm de largo pero puede ser más corta. El extremo ancho se dirige hacia afuera, hacia arriba y hacia atrás. Su extremo estrecho casi se acerca al de la vesícula contralateral. Las vesículas seminales se palpan por el recto cuando la vejiga urinaria está llena. Cuando las vesículas seminales están llenas, son muy sensibles a la presión¹⁷.

Estudios anatómicos antiguos de vesículas seminales indicaban erróneamente que el esperma se acumula en ellas, de donde el nombre que

tienen de "vesículas seminales". Estas estructuras sólo son glándulas secretorias, no zonas de almacenamiento de esperma.

Las vesículas seminales están revestidas de epitelio secretorio que produce un material mucoide rico en celulosa y pequeñas cantidades de ácido ascórbico, inositol, ergotioneína, cinco aminoácidos, fosforilcolina, prostaglandina y fibrinógeno. Durante la eyaculación cada vesícula seminal vacía su contenido en el conducto eyaculador al unísono que el conducto deferente vacía el semen. Esto aumenta considerablemente el volumen de semen eyaculado, la celulosa y otras sustancias contenidas en el líquido seminal tienen gran valor nutritivo y protector para los espermatozoides hasta que uno de ellos fertiliza el óvulo. Se cree que las prostaglandinas contribuyen a la fertilización de dos formas:

- Reaccionan con el moco cervical para hacerlo más receptivo al espermatozoide.
- Causan quizá contracciones peristálticas inversas en el útero y las trompas de Falopio para desplazar los espermatozoides hacia los ovarios (unos cuantos alcanzan el extremo superior de las trompas de Falopio en espacio de cinco minutos)¹⁶.

B. GLANDULAS BULBOURETRALES [GLANDULAS DE MERY COWPER]

Las glándulas de Cowper (bulbouretrales) son dos estructuras redondeadas de 0.5 a 1.5 cm de diámetro, situadas a cada lado del plano medio. Están incluidas en la estructura del esfínter de la uretra, por detrás de su porción membranosa. Secretan una sustancia como moco cuya función no está bien determinada ¹⁷, se cree que este líquido claro y viscoso, se vierte en la uretra posterior en el acto de la eyaculación. Este líquido favorece la aglutinación del esperma y su pasaje por la uretra¹⁸.

Los conductos de las glándulas de Cowper pasan por la membrana perineal, penetran en el bulbo del pene y atraviesan su estructura. Después de un trayecto de 2.5 a 4 cm, terminan abriéndose en la cara inferior de la porción esponjosa de la uretra¹⁷. Cada una de ellas tiene el volumen de un carozo de cereza con un conducto excretor dirigido hacia abajo, adelante y medialmente; los dos conductos desembocan muy cerca uno de otro en la uretra¹⁸.

Cada pequeña glándula bulbouretral (de Cowper) posee una delgada cápsula de tejido conectivo, cuyos tabiques subdividen la glándula en lobulillos. Las células de cúbicas a cilíndricas que revisten la luz de la glándula poseen núcleos aplanados, de localización basal¹⁵.

C. PRÓSTATA

Es la glándula desarrollada alrededor de la parte inicial de la uretra. Forma parte del aparato genital, si bien su posición y relaciones la unen a la vejiga y a la uretra, órganos urinarios¹⁸.

El tamaño de la próstata es variable. Los diámetros más grandes de una próstata libre de enfermedad, son aproximadamente los siguientes: transversal, 4 cm; vertical, 3 cm; anteroposterior, 2 cm. El acceso a la próstata se logra por medio de una de las siguientes rutas: transvesical, retropúbica, perineal o uretral¹⁷.

La próstata firme y elástica, es rudimentaria en el niño. Se desarrolla en la pubertad y a partir de los 50 años sufre una involución fibrosa. Puede entonces ser asiento de neoformaciones benignas: adenomas prostáticos, o malignos: cánceres, que obstaculizan la micción. La próstata está envuelta por una cápsula fibrosa, adherente al tejido glandular, que emite prolongaciones hacia el interior de la glándula¹⁸.

Los cambios en las concentraciones de andrógenos afectan al tamaño y a la estructura de la próstata. Es pequeña en el momento del nacimiento, pero en la pubertad rápidamente aumenta de tamaño y, después de medio año o un año de crecimiento rápido, alcanza su forma adulta. Durante el quinto decenio disminuye de tamaño y ocurre la atrofia del tejido glandular.

La próstata normal puede palparse por el recto como una hinchazón elástica con un surco medio que termina por arriba en una escotadura. La parte superior de la cara posterior está relacionada con las vesículas seminales y los extremos inferiores de los conductos deferentes y, cerca de la base, presenta depresiones pequeñas para la entrada de los conductos eyaculadores¹⁷.

Función de la glándula prostática

La próstata secreta un líquido alcalino claro de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida, una enzima coagulante y una profibrinolisisina. Durante la eyaculación la cápsula de la glándula prostática se contrae simultáneamente con las contracciones del conducto deferente y vesículas seminales, de manera que el líquido fluido y lechoso de la glándula prostática se une a la masa del semen. La característica alcalina esencial del líquido prostático puede ser muy importante para una buena fertilización del huevo, pues el líquido del conducto deferente es relativamente ácido debido a la presencia de productos terminales del metabolismo de los espermatozoos, y, en consecuencia, inhibe la fertilidad de los mismos. También las secreciones vaginales son de tipo muy ácido

(pH de 3.5 a 4.0). El esperma no logra su mejor motilidad hasta que el pH de los líquidos vecinos se eleva hasta aproximadamente 6 a 6.5. En consecuencia, es probable que el líquido prostático neutralice la acidez de los demás líquidos después de la eyacuación, y aumente considerablemente la motilidad y fertilidad de los espermatozoos¹⁶.

1.4. PENE

El pene es el órgano masculino de la copulación, situado debajo de la sínfilis pubiana, arriba de las bolsas testiculares con las cuales constituye los órganos genitales externos del hombre. Posee el poder de erección que lo hace apto para sus funciones copuladoras, gracias al tejido cavernoso eréctil, que constituye su armazón¹⁸. Por lo general se encuentra en estado de flaccidez. Sin embargo, durante la estimulación erótica se distienden con sangre sus tres cuerpos cilíndricos de tejido eréctil, a saber, los dos cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso. La presión de turgencia del líquido dentro de los espacios vasculares de los tejidos eréctiles aumenta el tamaño del pene por lo que se torna erecto y duro. Después de la eyacuación o de la estimulación erótica, sigue la detumescencia y el pene vuelve a su estado de flaccidez¹⁵.

Flácido, el pene, de forma cilíndrica, pende delante de las bolsas testiculares. Es muy móvil. Su longitud es de 10 a 12 cm en el adulto. En estado de erección aumenta de volumen y de longitud, se vuelve rígido, se endereza delante del pubis y de la pared abdominal¹⁸. El pene posee una vaina de piel y una gruesa cápsula de colágeno, la túnica albugínea, que rodea los tres cuerpos cilíndricos de tejido eréctil. Los dos cuerpos cavernosos de la parte dorsal están separados en forma incompleta entre sí mediante tabiques derivados de la túnica albugínea. El cuerpo cavernoso de la uretra (cuerpo esponjoso) contiene la porción esponjosa de la uretra. Los espacios vasculares de los tejidos están revestidos por endotelio¹⁵.

Anatómicamente se puede dividir en tres segmentos:

I. Extremidad proximal o raíz del pene.

Es la porción fija de este órgano, Comprende las raíces de los cuerpos cavernosos y el bulbo del cuerpo esponjoso, que son tres formaciones de tejido eréctil³. Está fijada al esqueleto por la inserción de los cuerpos cavernosos al pubis y en la línea mediana por el ligamento suspensor del pene: dicho ligamento se encuentra fijado a la línea blanca abdominal arriba de la sínfilis pubiana, y sus fibras elásticas caen sobre el pené para descender a veces, hasta el nivel de las bolsas testiculares¹⁸.

La raíz de cada cuerpo cavernoso se inserta en la parte inferior del isquion, y se dirige hacia arriba, aplicada a la rama descendente del pubis y cubierta por el isquio cavernoso para unirse a la del lado opuesto. Cerca del borde inferior de la sínfisis del pubis, las dos se dirigen hacia abajo. A partir de aquí se llaman cuerpos cavernosos propiamente dichos.

El bulbo del cuerpo esponjoso se localiza entre las raíces de los dos cuerpos cavernosos en el espacio perineal superficial, por arriba es aplanado y se inserta en la hoja inferior del diafragma urogenital. Por abajo y a los lados es redondeado y está cubierto por el bulbo cavernoso. Su porción posterior ensanchada es perforada en la parte superior de la uretra, que se extiende hacia adelante en su espesor. Al dirigirse hacia adelante se va adelgazando y se dobla hacia abajo para continuarse como cuerpo esponjoso del pene¹⁷.

II. Cuerpo cilíndrico.

Con una cara superior o dorsal: dorso del pene, y una cara inferior, escrotal². Es la porción libre y colgante del pene y está cubierto de piel. El dorso del pene es la cara que mira hacia adelante cuando el órgano está flácido, y hacia arriba y atrás cuando está erecto. La cara uretral mira en la dirección opuesta. Un reborde medio, el rafe peniano, se localiza en esta cara y se continúa con el del escroto. El cuerpo del pene está formado por los dos cuerpos cavernosos, que se continúan con sus raíces, y el cuerpo esponjoso, continuación del bulbo¹⁷.

a) CUERPOS CAVERNOSOS

Los cuerpos cavernosos constituyen la mayor parte del volumen del cuerpo del pene y forman el dorso y los lados del mismo. Al unirse dejan en la cara uretral un amplio surco medio en el que se sitúa el cuerpo esponjoso. Terminan en extremidades romas, que están cubiertas por el glande del pene¹⁷, existe uno a la derecha y otro a la izquierda. Son cilíndricos, adelgazándose hacia sus extremidades; se reúnen en la cara dorsal del pene bajo la sínfisis pubiana. En el surco dorsal transcurre la vena dorsal profunda, con la arteria y los nervios dorsales del pene. En el surco inferior, mucho más amplio, se aloja el cuerpo esponjoso que contiene la uretra. Adelante, los cuerpos cavernosos se adelgazan, se aplanan y se separan para formar un ángulo diedro de donde se desprende el ligamento anterior de ambos cuerpos cavernosos, que van a fijarse en la cúpula del glande¹⁸.

b) CUERPO ESPONJOSO

El cuerpo esponjoso es más delgado. Al recorrer el cuerpo del pene sufre un ligero estrechamiento, pero en su terminación se expande súbitamente para formar el glande del pene, cuya concavidad cubre las extremidades romas libres de los cuerpos cavernosos¹⁷, rodea la uretra perineal y peneana:

- Su parte posterior se aloja en la separación de los cuerpos cavernosos. Es dilatada y forma el bulbo el cual está situado entre la fascia profunda del perineo, con los músculos profundos del perineo y las glándulas bulbouretrales [de Cowper], arriba, y la fascia superficial, con músculo formación bulboesponjoso abajo.
- Su parte mediana ocupa el canal subcavernoso.
- Su extremidad anterior, está dilatada formando la cúpula del glande. A 1 cm por detrás del glande se divide en dos partes laterales, reunidas en la cara dorsal, pero separadas a nivel del surco por una hendidura estrecha que corresponde a la inserción del frénulo y se extiende hasta el ostio externo [meato]. Esta hendidura está ocupada por la mucosa uretral y luego por un sistema de tractos conjuntivos que unen ambas mitades del cuerpo esponjoso: ligamento inferior del glande¹⁸.

III. Extremidad distal.

Formada por el glande, rodeada de los tegumentos del pene que constituyen aquí el prepucio.

a) **GLANDE:** es liso, tapizado de mucosa. En su vértice se abre el meato urinario: ostio externo [orificio anterior] de la uretra. Su base o corona está conectada al prepucio por el cuello del glande (surco balanoprepucial)¹⁸. Superficialmente el glande está separado del resto del cuerpo del pene por este estrechamiento. La corona del glande es el borde prominente del mismo adyacente al cuello. Una doble capa de piel, el prepucio, se extiende a partir del cuello para cubrir el glande en una extensión variable¹⁷.

b) **PREPUCIO:** es un pliegue de los tegumentos dispuesto alrededor del glande y cuya cara interna es mucosa. La unión cutaneomucosa forma un orificio de donde el glande emerge más o menos y a veces lo oculta enteramente¹⁸.

El frenillo del prepucio es un repliegue medio que va de la capa profunda del prepucio a la parte de la cara uretral adyacente al orificio externo de la uretra. En raras ocasiones, el orificio uretral está situado en la cara inferior del pene o en el perineo (hipospadias), o en la cara dorsal (epispadias)¹⁷.

Los cuerpos eréctiles están envueltos por una membrana: la túnica albugínea, más delgada para el cuerpo esponjoso. Envía hacia la profundidad septos que circunscriben cavidades o aréolas que comunican entre sí y contienen sangre. Es el aumento de la circulación sanguínea el que distiende los cuerpos eréctiles y produce la erección¹⁸.

Los cuerpos se dividen en muchos espacios llenos de sangre, los espacios cavernosos, mediante abundantes trabéculas que se extienden dentro de ellos a partir de la túnica albugínea y del tabique peniano. Estas trabéculas se extienden en todas direcciones a través del tejido eréctil. Están formadas por fibras colágenas, elásticas y musculares lisas, y son atravesadas por arterias y nervios¹⁷.

El conjunto de todos los tejidos, nervios y arterias que conforman al aparato reproductor masculino proveen el soporte físico y mecánico para llevar a cabo las funciones reproductivas propias del varón.

En medicina legal el estudio de las condiciones físicas del acusado de delitos sexuales esta enfocado principalmente a la exploración del aparato sexual masculino con el fin de buscar signos de coito reciente, así como determinar su capacidad para realizar el acto sexual masculino, el cual involucra además otros elementos físicos y psíquicos complejos, como se tratara de ilustrar en el apartado siguiente.

2. ACTO SEXUAL MASCULINO

ESTIMULO NEURONAL DEL ACTO SEXUAL MASCULINO

La fuente más importante de impulsos para iniciar el acto sexual masculino es el glande del pene, que contiene un sistema sensitivo de órganos terminales muy organizados, transmisores hacia el sistema nervioso central de una modalidad muy especial de sensación llamada sensación sexual. La acción de masaje sobre el glande en el curso del coito estimula los órganos terminales sensitivos, y las sensaciones sexuales, a su vez, siguen por los nervios pudendos, de ahí a través del plexo sacro hacia la porción sacra de la médula espinal, y, finalmente, subiendo por la médula a zonas indefinidas del cerebro. Pueden penetrar también impulsos en la médula espinal procedentes de zonas vecinas del pene para ayudar a estimular el acto sexual. Por ejemplo, al ser estimulados, epitelio anal, escroto, estructuras peneales en general, todos mandan impulsos a la médula, que se suman a la excitación sexual.

Las sensaciones sexuales pueden incluso originarse en estructuras internas como zonas irritadas de uretra, vejiga, próstata, vesículas seminales, testículos y conductos deferentes. De hecho, una de las causas del "impulso sexual" probablemente sea la repleción excesiva de los órganos sexuales con secreción. La infección e inflamación de estos órganos sexuales a veces puede causar un deseo sexual casi continuo, y las drogas "afrodisíacas" como las cantáridas, aumentan el deseo sexual irritando la mucosa vesical y uretral.

Elemento psíquico de la estimulación sexual masculina.

Los estímulos psíquicos adecuados pueden aumentar considerablemente la capacidad de una persona para llevar a cabo el acto sexual. Simples pensamientos sexuales, o incluso sueños en los cuales se está efectuando el coito, pueden hacer que se produzca el acto sexual masculino y termine en eyaculación. De hecho, las emisiones nocturnas durante los sueños se producen en muchos varones en diversas etapas de su vida sexual, especialmente en la adolescencia.

Integración del acto sexual masculino en la médula espinal.

Aunque generalmente intervienen factores psíquicos desempeñando un papel muy importante en el acto sexual masculino, y de hecho pueden iniciarlo, probablemente el cerebro no sea necesario para llevarlo a cabo, pues una estimulación genital adecuada puede causar eyaculación en los animales y a

veces en el hombre, después que han sufrido la sección de la médula espinal por encima de la región lumbar.

El acto sexual masculino resulta, pues, de mecanismos reflejos integrados en médula espinal y lumbar, que pueden iniciarse por estimulación psíquica o por estimulación sexual verdadera¹⁶.

ANATOMIA FUNCIONAL DE LA ERECCIÓN

El pene es el órgano de la copulación en el hombre. La introducción en la vagina femenina se hace posible por la erección, que transforma el pene flácido en un órgano más voluminoso y rígido, tendido hacia adelante y arriba.

La erección es debida a un flujo sanguíneo masivo al seno de los tejidos eréctiles que rodean la uretra perineal y peneana (cuerpos cavernosos y cuerpo esponjoso). La erección exige, por lo tanto, una vascularización arterial intacta así como un drenaje venoso satisfactorio.

La imposibilidad de la erección es la impotencia. La permanencia de la erección es el priapismo.

La erección es un fenómeno reflejo que obedece a estímulos centrales (excitación psíquica, táctil, visual, olfativa) o estímulos periféricos directos.

2.1. ETAPAS DEL ACTO SEXUAL MASCULINO

ERECCIÓN

La erección es el primer efecto de la estimulación sexual masculina; el grado de erección es proporcional al grado de estimulación, tanto física como psíquica¹⁶. Durante la copulación el pene deposita el semen que contiene espermatozoides en el tracto genital femenino. También es el órgano excretor de la orina¹⁵.

Mecanismo de la erección.

La erección se inicia con la dilatación de las arteriolas del pene. Conforme se llena el tejido eréctil del pene con sangre, las venas se comprimen bloqueando el flujo de salida y aumentando la turgencia del órgano¹⁹. Cada cuerpo eréctil

contiene grandes espacios cavernosos revestidos por endotelio y está rodeado por una gruesa cápsula de tejido conectivo, la túnica albugínea. Los cuerpos eréctiles están irrigados por las arterias helicinas, que por lo general, son obviadas por cortocircuitos arteriovenosos que mantienen el pene en estado de flaccidez. Los impulsos parasimpáticos sobre estos cortocircuitos producen vasoconstricción que dirige la sangre hacia las arterias helicinas y, en consecuencia, hacia los espacios cavernosos. Los cuerpos eréctiles (en especial los cuerpos cavernosos) aumentan de tamaño por el ingreso de sangre y el pene se pone erecto.

Después de la eyaculación o si no hay estímulos continuados, la estimulación parasimpática cesa, disminuye el flujo sanguíneo hacia las arterias helicinas, la sangre abandona lentamente los espacios cavernosos y el pene retorna a su condición de flaccidez¹⁵.

LUBRICACIÓN.

Durante la estimulación sexual, los impulsos parasimpáticos, además de provocar la erección, estimulan la secreción de moco por las glándulas de Littré y las glándulas bulbouretrales. Este moco sigue por la uretra durante el coito para ayudar a la lubricación. Sin embargo, la mayor parte de la lubricación en el coito la proporcionan los órganos sexuales femeninos más que los masculinos. Sin buena lubricación, el acto sexual masculino raramente tiene éxito, porque el coito no lubricado produce impulsos dolorosos que inhiben las sensaciones sexuales en lugar de estimularlas¹⁵.

EMISIÓN Y EYACULACIÓN.

Se cree que la emisión empieza con la contracción del epidídimo, el conducto deferente y la ampolla, provocando la expulsión de espermatozoides hacia la uretra. Luego, contracciones de las vesículas seminales y de la capa muscular de la próstata expelen el líquido seminal y el líquido prostático, impulsando los espermatozoos en dirección anterógrada. Todos estos líquidos se mezclan con el moco ya secretado por las glándulas bulbouretrales para formar el esperma. El proceso hasta este momento se llama de emisión.

El llenado de la uretra desencadena luego las señales que son transmitidas por los nervios pudendos a las regiones sacras de la médula. A su vez, hay impulsos nerviosos rítmicos que se mandan desde la médula a los músculos esqueléticos que rodean la base del tejido eréctil, originando aumentos de presión a este nivel de tipo rítmico, a modo de ondas, que "exprimen" el esperma desde la uretra al exterior. Este es el proceso de eyaculación¹⁶.

La eyaculación es la expulsión forzada del semen por el tracto genital masculino (uretra). La fuerza requerida para la eyaculación deriva de la contracción rítmica de las gruesas capas de músculo liso del conducto deferente¹⁵ y la contracción del músculo bulbocavernoso, que es un músculo esquelético¹⁹.

Cada eyaculación contiene espermatozoides suspendidos en líquido seminal. Las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino, la próstata y las glándulas bulbouretrales, además de las vesículas seminales (e incluso las glándulas de Littre) contribuyen a formar la porción líquida del semen¹⁵. Al final de la eyaculación, la estimulación de los nervios simpáticos produce probablemente una constricción de las arterias, la sangre pasa a las venas y el pene vuelve a su estado flácido¹⁷.

2.2. SEMEN

El líquido que se eyacula durante el orgasmo, el semen, contiene espermatozoides y las secreciones de las vesículas seminales, próstata, glándulas de Cowper y, probablemente, de las glándulas uretrales. El volumen promedio de material eyaculado es de 2.5 a 3.5 mL después de varios días de abstinencia. El volumen de semen y el recuento de espermatozoides disminuyen notoriamente con eyaculaciones repetidas.

Composición del semen humano¹⁹

Color	Blanco, opalescente	
Densidad específica	1.028	
PH	7.35 a 7.50	
Cuenta normal	En promedio cerca de 100 millones/mL con menos 20% de formas anormales.	
Otros componentes	Fructosa (1.5 a 6.5 mg/mL) Fosforilcolina Ergotioneína Ácido ascórbico Flavinas Prostaglandinas	De las vesículas seminales (aportan 60% del volumen total)
	Espermina Ácido cítrico Colesterol fosfolipidos Fibrinolisisina, fibrinogenasa Cinc	De la próstata (aportan 20% del volumen total)
	Fosfato	Amortiguadores
	Fosfatasa ácida	
	Bicarbonato	
	Hialuronidasa	

La mayor parte del esperma está formada por líquido vesicular seminal (aproximadamente 60%), el último en ser eyaculado, que sirve para mandar los espermatozoos fuera del conducto eyaculador y de la uretra. El pH medio del esperma combinado es de aproximadamente 7.5; el líquido prostático alcalino ha neutralizado la ligera acidez de otras porciones del semen¹⁹.

El líquido prostático da al semen el aspecto lechoso, mientras que el líquido de las vesículas seminales y las glándulas mucosas le da su consistencia peculiar. De hecho, la enzima coagulante del líquido prostático hace que el fibrinógeno del líquido de la vesícula seminal forme un coágulo débil, que se disuelve en plazo de 15 a 20 minutos por la lisis que origina la fibrinolisisina formada a partir de la profibrinolisisina prostática¹⁶.

Bioquímica del semen

El plasma seminal es un medio biológico complejo que sirve de vehículo y de medio nutritivo para los espermatozoides. La determinación de los constituyentes bioquímicos debe realizarse tan rápido como sea posible tras la eyaculación, preferentemente en el plasma seminal obtenido después de la centrifugación. La composición bioquímica del semen difiere claramente de la del suero sanguíneo; además, ciertos constituyentes son específicos de alguna de las secreciones que forman el semen.

La concentración de electrolitos es semejante a la del suero, aunque la concentración de sodio es menor (120 mmol/L) y la de potasio mayor (23 mmol/L). Entre los aniones, la concentración de cloruro es baja (43 mmol/L) y la de ácido carbónico es idéntica a la del plasma.

Constituyentes minerales del líquido seminal

Ion	Concentración (mmol/L)
Cloruro	43
Carbonato	22 – 26
Sodio	121
Potasio	23
Calcio	7
Magnesio	3.6
Zinc	2.1

Una particularidad del semen es su elevada concentración en Zn de origen prostático: de 100 a 350 mg/L, con un valor medio de 140 mg/L.

El semen prácticamente no contiene glucosa, sólo unos 7 mg/dL; sin embargo, posee fructosa en concentraciones elevadas, aproximadamente 300 mg/dL. La fructosa deriva de la secreción de las vesículas seminales y de las ampollas deferenciales. Desde hace tiempo se considera a la fructosa como la principal fuente energética de los espermatozoides, aunque existe una correlación negativa entre la concentración de fructosa y la movilidad de los espermatozoides. Asimismo, el semen humano posee unos 10 mg/dL de sorbitol, un intermediario entre la glucosa y la fructosa, así como unos 55 mg/dL de inositol y glicerol.

El plasma seminal posee numerosos ácidos orgánicos. Los ácidos pirúvicos (unos 29 mg/dL) y láctico (unos 35 mg/dL) son productos de la glucólisis y de la fructólisis. El principal ácido orgánico es el ácido cítrico, que presenta unos valores muy dispersos entre especímenes (180 a 840 mg/dL). El ácido cítrico contribuye a mantener la presión osmótica del semen y lo utilizan los espermatozoides en el ciclo tricarbóxico. La secreción prostática es la que aporta el citrato. Otros ácidos presentes son el ácido siálico (unos 125 mg/dL) y el ácido ascórbico (unos 10 mg/dL).

El plasma seminal contiene tres veces menos lípidos que el plasma sanguíneo. El colesterol representa el 55% de los lípidos totales, el resto está formando por fosfolípidos (unos 80 mg/dL), lecitinas y esfingomielina. Las lecitinas participan en la conservación de los espermatozoides. Asimismo, el plasma seminal posee glicerofosforilcolina (unos 60 mg/dL) de origen epididimario y fosforilcolina (unos 300 mg/dL). Estos compuestos, se hidrolizan por la fosfatasa ácida del semen, liberando colina, cuya concentración aumenta con la conservación.

En medicina legal se ha utilizado la formación de cristales de peryodato de colina, para identificar las manchas de esperma, bajo el nombre de cristales de Florencia.

El plasma seminal posee una concentración de aminoácidos libres de aproximadamente, 1200 mg/dL. En orden decreciente, los principales aminoácidos son Glu, Ser, Lys, His, Asp y Leu. Los aminoácidos azufrados aparecen en concentraciones muy bajas. En el líquido epididimario, la carnitina se encuentra en concentraciones muy elevadas (1.5 - 53 mg/dL), transportada desde el torrente circulatorio. La carnitina parece desempeñar una función importante en la maduración del semen y en la adquisición de potencial para la movilidad. Por otra parte, la carnitina reduce la motilidad y aumenta el estado quiescente de los espermatozoides en el epidídimo.

El plasma seminal posee poliaminas: putrescina, espermina (bajo forma de difosfato) y espermidina. No se ha encontrado una relación entre la concentración de poliaminas y la calidad del semen. El olor característico del esperma se debe a un producto de la oxidación de la espermina. Este compuesto cristaliza espontáneamente en el semen que se deja en un portaobjetos y se forman los denominados cristales de Charcot que se utilizan en medicina legal para identificar las manchas de semen. El plasma seminal también posee glutatión, que desempeña una función protectora de los espermatozoides (unos 30 mg/dL).

La concentración de proteínas del plasma seminal es inferior a la del plasma venoso, oscilando entre 35 y 55 g/L. La electroforesis muestra un perfil muy diferente al del suero sanguíneo: 6.3% de albúmina, 15.9% de α -globulinas, 41.1% de β -globulinas y 23.2% de γ -globulinas; asimismo, una parte de las proteínas seminales no migran (13.5%).

En el plasma seminal se han detectado más de 50 enzimas, especialmente hidrolasas y deshidrogenasas. Entre las hidrolasas, la α -glucosidasa se considera específica de las funciones epididimarias. La hidrolasa más conocida es la fosfatasa ácida de origen prostático, cuyos aumentos en los cánceres de próstata también se detectan a nivel sérico.

Existen numerosos esteroides en plasma seminal, sobre todo andrógenos, como la testosterona, la 5α -dihidrotestosterona (5α DHT), la androstenediona y la dehidroepiandrosterona, y estrógenos como el 17β -estradiol y, sobre todo, estrona y progestágenos, progesterona, 17α -hidroxiprogesterona y pregnenolona. paralelamente, el plasma seminal posee concentraciones importantes de sulfoconjugados de estrógenos.

En el plasma seminal, lugar donde se identificaron por primera vez, están presentes numerosas prostaglandinas de los grupos A, B, E y F. Proceden de la secreción de las vesículas seminales y no de la próstata y tienen una vida media muy breve (1 a 3 min); de ahí que sea difícil la determinación de sus concentraciones²⁰.

En ciertas ocasiones, se puede solicitar al laboratorio que determine si existe semen en una muestra de cualquier tipo. Un ejemplo importante de estos casos es una probable violación. Puede ser posible examinar la muestra al microscopio en busca de espermatozoides, y se obtienen mejores resultados mejorándola con xileno y examinando bajo el microscopio de fases. Sin embargo, un procedimiento más confiable es el examen químico del material para determinar el contenido de fosfatasa ácida. Ya que el líquido seminal es el único líquido corporal con una alta concentración de fosfatasa ácida, la detección de esta enzima puede confirmar la presencia de semen en dicha muestra.

Con frecuencia se puede obtener mayor información practicando una tipificación del grupo sanguíneo ABO, y análisis de histocompatibilidad (HLA) y de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) en la muestra²¹.

2.3. ESPERMATOGENESIS

Es el proceso de producción de gametos masculinos haploides¹⁵, se produce en todos los túbulos seminíferos que contienen gran número de células pequeñas y medianas, denominadas espermatogonias, situadas en dos o tres capas a lo largo del borde externo tubular (ver figura 1).

La primera parte de la espermatogénesis es el crecimiento de algunas espermatogonias para formar células mucho más voluminosas llamadas espermatocitos primarios. Una vez que los cromosomas de estas células se duplican por sí mismos para formar cromátides (haciendo un total de 96 cromátides por célula), el espermatocito sufre dos rápidas divisiones meióticas sin la formación de nuevas cromátides. El resultado obvio de estas divisiones es la formación de cuatro células llamadas espermatídes, cada una de las cuales contienen solo 23 cromosomas no apareados¹⁶.

Las espermatídes no se dividen nuevamente, sino maduran en un promedio de 74 días para transformarse en espermatozoide, este proceso llamado espermiogénesis (ver figura 2), consiste en una citodiferenciación de los espermatídes en espermatozoides. La espermatíde pierde gran parte de su citoplasma (es fagocitado por las células de Sertoli) y forma un granulo acrosómico, una cilia larga, y asociado con fibras densas externas y una gruesa vaina fibrosa. El espermatozoide formado y liberado a la luz del túbulo seminífero es inmóvil e incapaz de fecundar al óvulo. Los espermatozoides permanecen inmóviles hasta que abandonan el epidídimo. Adquieren la capacidad de fertilizar cuando se han capacitado en el aparato reproductor femenino¹⁵.

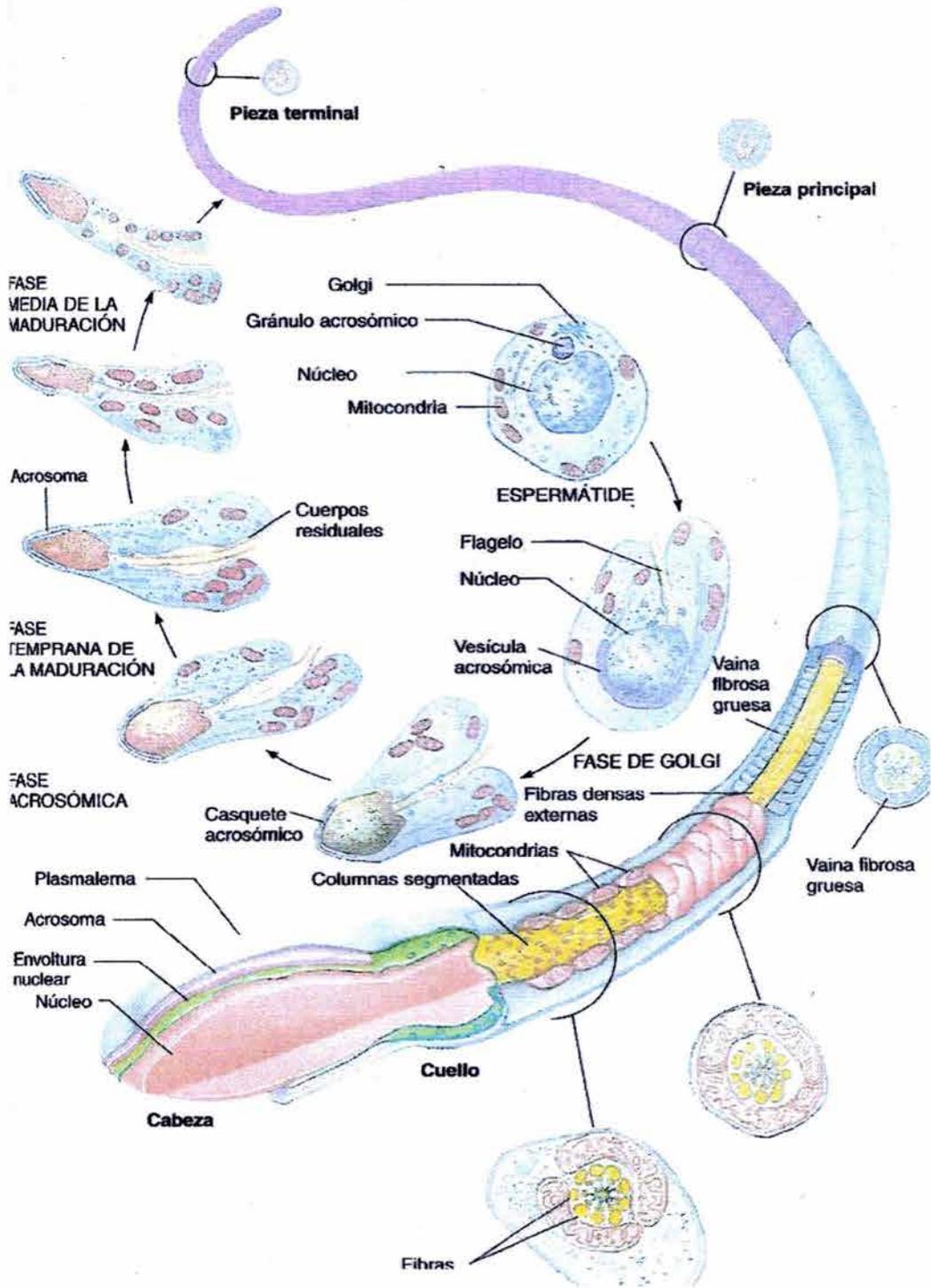
2.4. ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides son células alargadas que se movilizan por medio del flagelo y miden 55-65 micrometros.

Un espermatozoide maduro está compuesto básicamente por una cabeza y una cola. A su vez esta última es una secuencia de las siguientes porciones: Pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. La unión de la cabeza con la cola se llama cuello (ver figura 2).

Figura 2

Espermatozoide y Espermiogénesis



Cabeza.

Es ovalada y aplanada, su longitud oscila entre 4-5 micras y un ancho máximo de 3 micras, la parte anterior es más delgada que la posterior por lo que visto de perfil es piriforme. Está formada por el núcleo y por la caperuza acrosómica, la cromatina nuclear es condensada y solo queda interrumpida por vacuolas nucleares esporádicas. La caperuza acrosómica es una glucoproteína que contiene numerosas enzimas como proteasa, fosfatasa ácida, neuraminidasa e hialuronidasa y puede considerarse un lisosoma gigante especializado.

El núcleo está rodeado por dos membranas que contienen fosfolípidos. La membrana interna nuclear define al núcleo mismo. El espacio entre las membranas nucleares interna y externa se continúa con el lumen o la cavidad interna del retículo endoplásmico rugoso.

El citosol es la región no particulada del citoplasma, contiene un citoesqueleto compuesto por lo menos de tres clases de fibras: los microtúbulos (de 30 nm de diámetro) los microfilamentos (de 7 nm de diámetro) y los filamentos intermedios (de 10nm de diámetro) que ayudan a mantener la forma celular y la movilidad. Su composición incluye una elevada cantidad de proteínas (20 - 30 %) de manera que favorecen las interacciones débiles proteína-proteína.

Cuello.

La parte proximal de la cola es el cuello. Se trata de un segmento corto y estrecho que contiene el par de centriolos y un segmento de conexión, que forma los nueve anillos fibrosos que rodean al axonema. El centriolo proximal se localiza adosado al extremo basal de la cabeza, formando un ángulo de casi 45 grados con el eje de la cola.

La porción periférica del cuello contiene fibras gruesas que se continúan con las fibras orientadas longitudinalmente de la pieza intermedia. El par central de microtúbulos del flagelo se continúa adentro y más allá del cuello, mas cerca del centriolo proximal que los nueve pares dobles externos.

Cola

Pieza intermedia.

Mide de 5 a 9 micras aproximadamente y una micra de ancho, su porción central tiene la estructura típica de un flagelo o cilio alargado, es decir, un par central de microtúbulos simples rodeados por nueve pares dobles. Un aspecto característico de la pieza intermedia es la presencia de una vaina de mitocondrias

orientadas longitudinalmente. Las mitocondrias contienen dos membranas muy diferentes; la membrana externa que contiene porinas proteicas que hacen que la membrana sea permeable a moléculas de pesos moleculares de hasta 10,000 A. La membrana interna no contiene estas porinas y su composición es aproximadamente la mitad de lípidos y la mitad de proteínas que la externa.

Pieza principal.

Es la porción mas larga de la cola, mide de 40-45 micras y no tiene la vaina mitocondrial que hay en la cola intermedia. Un aspecto característico de la cola principal es la existencia de una vaina fibrosa, la cual vista desde microfotografias electrónicas aparece formada por muchos haces de varillas orientadas en círculos alrededor del complejo del filamento axial y finalmente se fusionan con las columnas longitudinales de fibras.

Pieza terminal.

Es relativamente delgada y corta (5-10 micras). Tiene el aspecto típico de un flagelo con dos microtúbulos simples rodeados por nueve dobles. Este flagelo es una estructura móvil que se extiende a partir de la membrana plasmática. el flagelo generalmente tiene un movimiento giratorio como el de un destornillador. es el único medio de locomoción que tienen los espermatozoides ^{8,9}.

El volumen usual de semen eyaculado con cada coito es, en promedio, de aproximadamente 3.5 mL, y en cada mililitro de semen hay un promedio de 120 millones de espermatozoides, aunque incluso en personas normales este número puede variar entre 35 millones y 200 millones. Esto significa un total medio de aproximadamente 400 millones de espermatozoides en cada eyaculación. Cuando el numero de espermatozoides por mililitro es menor de unos 20 millones es casi segura la esterilidad ¹⁶.

Los espermatozoides humanos se mueven a una velocidad de aproximadamente 3 mm/min a través de las vías genitales femeninas, alcanzan las trompas uterinas de 30 a 60 minutos después de la cópula ¹⁹.

En los primeros minutos después de la eyaculación, los espermatozoos se conservan relativamente inmóviles, probablemente por la viscosidad del coágulo. Sin embargo, cuando el coágulo se ha disuelto, los espermatozoos se vuelven muy móviles.

La actividad de los espermatozoides aumenta de manera considerable en medio neutro o ligeramente alcalino, pero se deprime considerablemente en medios ligeramente ácidos; los medios fuertemente ácidos pueden causar muerte

rápida de los espermatozoides. La actividad de los espermatozoides aumenta de modo considerable al elevarse la temperatura, pero esto también ocurre con el metabolismo, haciendo que la vida del espermatozoo se acorte.

Aunque los espermatozoos pueden vivir varias semanas en las vías genitales masculinas una vez eyaculados con el semen la máxima duración de su vida sólo es de 24 a 72 horas a la temperatura corporal. Sin embargo, bajando la temperatura puede conservarse el semen varias semanas; congelado a temperaturas inferiores a -100°C se ha conservado el esperma de algunos animales durante más de un año¹⁶.

En la investigación de delitos sexuales es de gran importancia el hallazgo de espermatozoides, pues constituye en sí una prueba de que ocurrió una eyaculación, sin embargo ésto no implica que halla existido una conducta delictuosa.

Al analizar el acto sexual masculino, se entiende también el impulso sexual, en lo que se justifican algunos individuos para la realización de actos que se consideran delitos, este es el caso de los delitos de índole sexual.

Lo cierto es que no siempre es el deseo sexual lo que motiva al violador, ni es este un sátiro necesariamente. "Un interesantísimo estudio a 170 violadores convictos y confesos, demostró que las disfunciones sexuales durante la tentativa de violación son bastante corrientes... muchos hombres no eyaculan durante la violación y otros lo hacen prematuramente, antes de poner las manos en la víctima"²².

En la medida en que se vayan realizando más y mejores estudios sobre el violador y su entorno social habrá mas posibilidades de dar a estos sujetos el trato que requieren y no solo etiquetarlos, estigmatizarlos y sancionarlos, lo que solo lleva a una venganza y desahogo social e individual pero no a la solución de los grandes problemas que estos delitos implican²².

3. DELITOS SEXUALES

El examen de presuntos delitos sexuales tanto en hombres como en mujeres, víctimas o acusados, ya sea vivos o muertos, es una de las tareas más difíciles en la investigación legal. Las grandes penas a menudo aplicadas a delitos como éstos, las consecuencias personales, sociales y familiares y el riesgo de permitir que estos delitos queden impunes, así como la injusticia de las sentencias erróneas, aumentan todavía más las responsabilidades del perito¹³.

La perversión sexual, es aquella que no sigue los elementos constitutivos formales de la función, en este caso la sexualidad, que no sólo es procreativa, sino también de proyección, protectora de la descendencia y de la comunicación interpersonal; debe ser íntima, completa y libremente aceptada por los dos miembros de la pareja²³.

Los delitos sexuales han recibido distintos nombres, en su agrupación conjunta, con el correr del tiempo y con las sociedades que los incorporaron a su legislación represiva. Así, incluidos en los "delitos contra las personas" o "delitos contra la honestidad" en algunos Códigos, dependiendo del país cambiará el título y la clasificación de estos. No pueden definirse en su conjunto pues, como ya veremos incluyen, en algunos países, conductas sexuales, en tanto otros no lo hacen, de modo que tan solo podríamos contentarnos con expresar " que son los actos sexuales o conductas sexuales penados por la legislación⁶.

Son figuras delictivas creadas por el legislador para reprimir y castigar los excesos ilegítimos del instinto sexual, cuando se hace uso de la violencia, o cuando se emplea la seducción o el engaño en caso de menores, o bien cuando en los mismos se realizan actos libidinosos, que atenten contra las buenas costumbres y la moral.

En consecuencia, para llamar en doctrina como sexual a un delito se requiere en primer lugar que su acción típica sea directa e inmediatamente de naturaleza sexual, que la conducta positiva del delincuente se manifieste en actividades lúbricas somáticas ejecutadas en el cuerpo del ofendido, o que a éste se le hacen ejecutar²⁴.

Constituyen un conjunto de delitos que tienen en común la falta de libertad en el consentimiento de la víctima para la relación sexual. Dentro de las legislaciones latinoamericanas, los delitos de importancia medicolegal son la violación, el estupro y la sodomía. El estupro es el acceso carnal, mediante la seducción, con una mujer honesta mayor de 12 y menor de 15 años (en algunos códigos la edad es hasta los 18 años). La sodomía es el acceso carnal con un varón cuya edad oscila entre 12 y 17 años³.

Para que exista un delito de carácter sexual, se requieren dos elementos principalmente:

- Que la acción realizada por el delincuente en el cuerpo del ofendido, o la que a éste se le hace ejecutar, sea de naturaleza sexual.
- Que los bienes jurídicos sean relativos a la vida sexual es decir, la libertad y la seguridad sexual, o bien evitar la prematura corrupción de los impúberes. Es indudable que la protección legal debe dirigirse con mayor atención al menor, que por motivos de edad, y en consecuencia por falta de criterio, no podrá darse cuenta ni del alcance ni de las consecuencias de sus actos en esta esfera y se encontrará indefenso ante sujetos ya con experiencia sexual o con enfermos mentales de tipo pasional.

A continuación se da una breve exposición de los delitos sexuales mencionados en el título decimoquinto de nuestro Código Penal Federal, de donde se tomaron las definiciones de cada delito, descritos por Fernández Perez²⁴.

Atentados al pudor

"Comete el delito de atentados al pudor, el que sin el consentimiento de una persona púber o impúber, o con el consentimiento de esta última, ejecuta en ella un acto erótico sexual, sin el propósito directo e inmediato de llegar a la cópula."

Los elementos Jurídicos del delito son:

1. Un acto erótico sexual (caricias o tocamientos libidinosos).
2. Ausencia de propósito directo e inmediato de llegar a la cópula {acto sexual incompleto; si se realiza la cópula desaparecería la figura delictiva que tratamos y surgiría, por ejemplo, la violación).
3. El tercer elemento varía según la aptitud fisiológica sexual del sujeto pasivo, según que sea púber o impúber, sin el consentimiento del primero o con su consentimiento, tratándose del segundo.

Los atentados al pudor son más frecuentes en jovencitas o niños, ya empleando el pene (coitos perineales), ya empleando las manos masturbando sus órganos genitales, o bien empleando la acción lingual con el mismo objeto, etc.

Estupro

"Al que tenga cópula con una mujer menor de 18 años, casta y honesta, obteniendo su consentimiento por medio de engaño".

Los elementos jurídicos de este delito son:

1. Acción de cópula. Introducción del pene en la vagina, aunque el acto se interrumpa intencionalmente. Se excluyen las fornicaciones contra natura (en partes del cuerpo no idóneos para el coito) porque su aceptación revela en la mujer ausencia de honestidad sexual, elemento valorativo exigido por el legislador para acordarle protección.
2. En la mujer menor de 18 años. La tutela penal se limita a mujeres muy jóvenes porque se piensa que son susceptibles de engaño y por juzgarse un peligro corruptor de prematura práctica sexual ilícita. A falta de acta de nacimiento, la edad se comprueba pericialmente por el aspecto y desarrollo general de la ofendida y particularmente por la ausencia de las terceras gruesas molares.
3. Que la mujer sea casta y honesta. Hacemos notar que nuestro Código Penal no tutela la virginidad, como el Código Español, por ejemplo, sino la castidad y honestidad. de tal manera que una mujer virgen no casta, que haya practicado anteriormente actos sexuales contra natura, no puede sufrir estupro; en cambio una mujer desflorada, con vida posterior casta, sí puede ser sujeto pasivo del delito. La castidad se presupone, es una virtud relativa a la conducta exterior del ser humano, que consiste en la abstención corporal de toda actividad sexual ilícita. La honestidad no sólo consiste en la abstención corporal de placeres libidinosos ilícitos, sino también en la correcta actividad moral y material en todo lo relacionado con lo erótico, es decir, en su correcta conducta erótico-sexual.
4. Que se haya obtenido el consentimiento por medio de engaño. El engaño se refiere a falsas promesas, generalmente de matrimonio, mentiras o falacias, lo que produce en la mujer un estado de confusión que la lleva a acceder a las pretensiones eróticas.

Rapto

Nuestro Código Penal señala "al que se apodere de una persona por medio de la violencia física o moral, o del engaño para satisfacer algún deseo erótico sexual o para casarse"

Los elementos del delito son:

1. Apoderamiento de una persona. Esta es la acción típica del delito, la que también presupone su segregación, separándola del medio de su vida habitual, para ingresarla en el medio controlado por el raptor.
2. El empleo de la violencia física o moral o el engaño.
3. Para satisfacer un deseo erótico sexual o para casarse.

incesto

Cuando ocurra que ascendientes tengan relaciones sexuales con sus descendientes, se aplicará la misma sanción en caso de incesto entre hermanos. Las causas del incesto son psíquicas, complejos de Edipo o de Electra, o sociales: promiscuidad cuando toda la familia vive en una sola habitación, o muy frecuentemente en nuestro medio también el alcoholismo y, claro está, el bajo índice cultural.

Este delito, que como se ve, tiene pluralidad de sujetos activos tiene los siguientes elementos:

1. Relaciones sexuales.
2. Entre ascendientes y descendientes o entre hermanos.

Etimológicamente incesto significa impureza y consiste, de una manera general, en la comunión sexual entre aquellos parientes tan próximos que la ley les impide contraer matrimonio; así pues la relación sexual se entiende que es el ayuntamiento o conjunción normal.

"El incesto y el abuso de menores se convierten en responsabilidad de todos. Todos tenemos que trabajar unidos para ayudar al niño, y esa es la razón por la que se trata de un problema social"⁵⁵.

Adulterio

Según el Código Civil, adulterio es la violación de la fidelidad que se deben los cónyuges, consistente en el ayuntamiento sexual realizado entre persona casada y otra ajena al vínculo matrimonial, de uno y otro sexo, que, como tal, es causal de divorcio. Por otra parte, el derecho penal, en el Código de la materia, sanciona este cuando se comete en el domicilio conyugal o con escándalo.

Ahora bien por la dificultad para denotar el discutible objeto de la tutela penal, por la dificultad practica de su comprobación en los juicios (salvo casos de sorpresa in fraganti copulando, o con confesión de los responsables) y por la inutilidad de la represión, la tendencia moderna es abolicionista del adulterio como delito en el Código Penal.

Violación

Al que por medio de la violencia física o moral tenga cópula con una persona, sea cual fuere su sexo, se le aplicarán las penas que la ley designe. Si la persona ofendida fuera impúber, la pena de prisión será de mayor o la prevista por la ley.

Los elementos del delito de violación son:

1. Cópula. Cualquier tipo de ayuntamiento o conjunción sexual con eyaculación o sin ella. Cabe aquí aclarar que el concepto anterior de cópula es el que contempla el Código Penal (en medicina legal entendemos por cópula el acto sexual normal, introducción del pene en erección en vaso idóneo, que es la vagina, y coito cualquier tipo de ayuntamiento o conjunción sexual, es decir, este es el término genérico y aquel el término específico), y a diferencia del estupro, el acto sexual puede ser normal, o sea introducción del pene en la vagina, o bien anormal, introducción del pene en vaso no idóneo, como es el recto. En personas de cualquier sexo. La Ley mexicana extiende su protección también a los hombres que han sido víctimas de una fornicación violenta.

2. Que se realice sin la voluntad del ofendido. La ausencia de consentimiento es el elemento diferencial del delito. Si el paciente acepta voluntariamente la violencia, como acontece en ciertas prácticas sadistas y masoquistas, consentidas, desaparece la figura de violación.

3. Que se efectúe por medios violentos, ya sean físicos o morales. Violencia física: empleo de fuerza material en el cuerpo del ofendido para vencer su resistencia a dejarse copular, como golpes, heridas, sujeciones por terceros; violencia moral: empleo de amenazas de males graves hacia la persona sujeto pasivo del delito o para sus familiares, que por la intimidación que producen le impiden resistir el ayuntamiento.

Por otra parte el Código Penal señala que se equipara con la violación y se sancionará con las mismas penas la cópula con persona menor de 12 años o que por cualquier causa no esté en posibilidad de producirse voluntariamente en sus relaciones sexuales o de resistir a la conducta delictuosa.

En el caso de que la persona ofendida fuera impúber, por este solo hecho, aunque concorra voluntariamente a determinado sitio y fuere desflorada, no supone forzosamente que haya tenido voluntad de verificar el acto, y en atención a la edad tan corta del impúber, la cópula que se tenga con él deberá interpretarse como equivalente a la violación por su imposibilidad de resistir. En el Código Penal, con muy buen sentido se configura el delito que se equipara con la violación, en el que en realidad no hay una violencia física ni moral, en caso de cópula con persona con cualquier forma de enajenación mental, o privadas de sentido, con pérdida transitoria de la ideación consciente, como en el sueño fisiológico, sueño patológico como en estado de coma o un síncope, o bien sueño por drogas (como barbitúricos) la cópula se efectúa no en contra, pero sí en ausencia de consentimiento del ofendido, en ausencia de su voluntad.

Cuando la violación fuere cometida con la intervención directa o inmediata de dos o más personas, la condena de prisión aumenta así como la multa y a los demás partícipes se les aplicará las reglas contenidas en el Código Penal.

Además de las sanciones que señalan los artículos que anteceden, se impondrán penas adicionales de prisión cuando el delito de violación fuere cometido por un ascendiente contra su descendiente, por éste contra aquél, por el tutor en contra de su pupilo, por el padrastro o amasío de la madre del ofendido en contra del hijastro. En los casos en que la ejerciere, el culpable perderá la patria potestad o la tutela, así como el derecho de heredar al ofendido.

Cuando el delito de violación sea cometido por quien desempeñe un cargo o empleo público o ejerza una profesión utilizando los medios o circunstancias que ellos le proporcionen, será destituido del cargo o empleo o suspendido del ejercicio de dicha profesión²⁴.

Desde el punto de vista legal el consentimiento puede ser:

- a) Negado;
- b) Ausente por inconsciencia etcétera;
- c) No válido por razones de incapacidad legal para formularlo, sea por edad (menor de 12 años), sea por estado mental, (alienación mental);
- d) Válido: Cuando es expresión del libre discernimiento de quienes no tienen impedimento legal para expresarlo.

Consentimiento y signos.

1) El consentimiento negado o ausente puede expresarse antes, o después de la violación mediante:

- a) Gritos o pedidos de auxilio: cuando se suponga su ausencia puede demostrarse los signos del impedimento, tales como afonía, mordaza con objeto o manual (lesiones peribucales y bucales en el vestíbulo por la presión o por las uñas), etc.
- b) Signos del estado de inconsciencia: signos de intoxicaciones barbitúricas, de curas de sueño, etc.; de lesiones de caída o mordeduras, etc; en epilepsia, etcétera ;
- c) Señales de la fuerza a la que cedió. Traumatismos de cráneo inconsciencia provocada para el delito; lesiones de caída (derribamiento) en, codos, occipucio, zona glútea y a nivel de ambos omoplatos; desgarros de ropa, arrancamiento de botones; arrancamiento de pelos genitales (labios mayores) y excoriación de zonas de presión predesgarro de los elásticos de ropas interiores; lesiones de la separación de los muslos, dejadas por rodillas, manos, uñas. Debe tenerse en cuenta en la lucha que la negativa puede ser continuada hasta la convicción de la inutilidad o inconsciencia, sin que un debilitamiento precoz pueda interpretarse como consentimiento. Además debe tenerse en cuenta el número de agresores;
- d) Signos de las causas violentas que aun con conservación de la conciencia impidieron resistir: ataduras, esposamiento, lesiones en muñeca, en zona lumbar, etcétera;
- e) Signos de las causas patológicas que aun con conservación de la conciencia impidieron resistir: enfermedad invalidante, tratamientos de inmovilización (yeso, vendajes, etc.).

2) El consentimiento no válido puede ser demostrado en su causa:

- a) Signos de alienación mental anterior al acto: el examen psiquiátrico de la víctima informará adecuadamente. Debe descartarse la alienación mental posterior al acto que, en caso de presentarse y ser causada por el acceso carnal, constituye el agravante "grave daño en la salud", en las legislaturas que lo manejan.
- b) Menor de doce años al día del acto: la ley se vale de la edad civil y no admite desincriminación por precocidad sexual de la víctima. En los casos en que no se conozca la edad de la víctima se determinara esta por el medico de acuerdo a las características físicas de esta. En general más de la mitad de las víctimas son menores de 15 años;
- c) Estado de inconsciencia: el diagnóstico se hará basándose en datos de amnesia, iniciación del estado, terminación, datos de los exámenes biopsicosociales y de laboratorio realizados, anteriores y actuales a modo de efectuar un diagnóstico panorámico y multidimensional;
- d) Estado de enfermedad que impide resistir: permite en términos generales su fácil constatación y las necesidades terapéuticas que son objetivas;
- e) Intimidación: junto a la valoración jurídica de la intensidad de la intimidación, puede pedirse la valoración médico legal de la intimidabilidad de la víctima.

La intimidación puede ser

- I. Intimidación por presencia;
- II. Intimidación verbal;
- III. Intimidación por armas:
 - a) Estaban a la vista;
 - b) Énfasis en ellas;
- IV. Intimidación por fuerza física, sin lesionar;
- V. Intimidación por fuerza física o armas que provocan lesiones;

VI. Intimidación previa a homicidio para facilitar, ocultar, sádico o ensañamiento.

- f) **Uso de fuerza:** La fuerza de un solo sujeto de desarrollo físico corriente, que sólo realice lucha sin recurrir a golpes o maniobras de asfixia que tornen inconsciente a la víctima o a ataduras o anestésicos que dificulten la defensa de una víctima de desarrollo físico corriente, puede impedir temporalmente un acceso carnal violento, puede dificultar sin impedirlo, puede consentir finalmente ante la libido estimulada, puede consentir ante la inutilidad del esfuerzo (es continuado, pero no constante). El estado de ebriedad ligera y media puede estimular la acción agresora por estímulo de la agresividad en general, pero casi siempre la potencia sexual disminuye y facilita la defensa contra el acceso carnal. La "alcoholización de darse coraje" es más frecuente y de peligrosidad mayor. Las lesiones de lucha no sólo dejan estigmas en la víctima (muslos y antebrazos en especial) sino también en el agresor (cara, dorso abdomen, etc.). Cuando son varios los agresores, por lo general los traumatismos son menores, pues los cómplices sujetan firmemente e impiden la defensa de la víctima que, en general, luego de la lucha inicial, desiste ante la superioridad y el temor de daño mayor⁶.

Hipnosis y violación

La amplia mayoría de la doctrina científica coincide en afirmar que no existe la posibilidad material de concretar una violación mediante hipnosis por cuanto la víctima se despierta si es que no estaba dispuesta a consentir el hecho.

La ebriedad alcohólica puede admitirse como causa de violación a partir del segundo estado. La ebriedad cocaínica puede disminuir la resistencia de la víctima por la intensa estimulación simpática, pero no cursa con pérdida de conciencia²⁵.

3. 1. TIPOS DE COITO Y LESIONES

COITO VAGINAL

Es la penetración del pene en la cavidad vaginal, aunque no sea completa, ni prolongada, ni haya eyaculación en el interior de la vagina; se considera como delito contra la libertad sexual y no es necesario que la mujer sea virgen para la misma consideración.

Signos propios de la desfloración en la mujer virgen

Son de tres tipos:

- A. Desgarros himenales
- B. Lesiones genitales.
- C. Signos biológicos.

A. DESGARROS DEL HIMEN

El desgarro es una herida con labios rotos, sangrantes y tumefactos. Llega siempre hasta la base de implantación del himen en la pared vaginal. Los bordes epitelizan en aproximadamente cuatro días. Suele ir acompañado de dolor y una pequeña hemorragia, dependiendo su intensidad del tipo de mujer; según el número y posición de los desgarros éstos pueden ser: típicos y atípicos.

1. Desgarros himenales típicos:

- a) El himen anular suele desgarrarse en cuatro puntos, dos en cada lado y simétricos entre sí.
- b) El himen semilunar suele desgarrarse en dos puntos laterales que dejan un colgajo intermedio a nivel del refuerzo de la columna posterior.
- c) El himen labiado suele desgarrarse a nivel de las comisuras.

Para describir la localización de los desgarros suele utilizarse como referencia la esfera horaria

2. Desgarros atípicos. Toda localización diferente da lugar a un desgarro atípico, igual para su número.

3. Antigüedad y otras características del desgarro:

- a) Los desgarros recientes presentan bordes rojos. es decir, que su data de producción es menor de 4 días. En cambio en los desgarros antiguos ya cicatrizados, su data es con seguridad mayor de 4 días.

- b) La cicatrización es rápida, los bordes cicatrizan por separado. es decir no se sueldan jamás. El diagnóstico diferencial se hará con las muescas congénitas, que nunca llegan a alcanzar el borde de inserción de la membrana y al intentar aproximar las dos muescas hay una sucesión de continuidad. En el desgarro himenal, al aproximar las dos lengüetas, coinciden y no hay sucesión de continuidad. Al cicatrizar, los desgarros forman las carúnculas himenales.

La observación del himen debe realizarse visualmente, utilizando un colposcopio o con colpofotografía incluso utilizando la luz de Wood.

B. LESIONES PRESENTES EN EL ATENTADO PEDERÁSTICO

Se encuentran frecuentemente en niñas y son desgarro en el perineo, tabique recto-vaginal e incluso en los fondos de saco vaginales. Son debidas a dos causas:

1. Desfloración de los órganos sexuales.
2. Violencia del acto sexual.

Teniendo en cuenta que el desarrollo anatómico de las partes genitales es proporcional a la edad pueden darse los siguientes casos:

1. Niñas menores de 6 años. El coito es anatómicamente imposible ya que el ángulo subpúbico es aún muy agudo por lo que constituye una barrera ósea.
2. Niñas entre 6 y 11 años. Es ya posible la cópula pero se producen grandes lesiones como desgarro del perineo o rotura del tabique rectovaginal.
3. De los 11 años a la pubertad. Es posible el coito. Si aparecen lesiones, son pequeñas y debidas a la violencia del acto.
4. Desde la pubertad en adelante. Las lesiones genitales son excepcionales y debidas sobre todo a la violencia.

Se concluye que las lesiones de las vías genitales originadas por la mano y cuerpos extraños son más frecuentes durante un delito de agresiones sexuales que en la violación. Aunque pueden ser también debidas a lesiones accidentales de caída o choque.

Es necesario tener presente el alto número de falsas imputaciones en primer lugar. Las violaciones sin violencia, consentimiento y participación infantil, verdaderas violaciones progresivas, pueden no ocasionar lesiones. En ese sentido debemos tener en cuenta la pubertad precoz, hecho que se acompaña de mayor desarrollo de los genitales internos y externos. Fuera de esa circunstancia podemos expresar que a menor edad mayores daños.

Debido a las maniobras vulvares pueden producirse: vulvitis, excoriaciones, ulceraciones, ungulaciones, equimosis en los grandes labios, flujo, uretritis, desfloración, etc.

Ninguno de estos signos por sí es patognomónico de violación. En aquellos casos en que hubo violencia, están los signos generales de la agresión y defensa.

La relación delincuente-víctima previa al hecho va desde lo desconocido y circunstancial al incesto de padres, hermanos, tíos y primos o la relación con novios, amigos, conocidos, personas de guarda, proveedores, etc., cuando no oportunística de carcelero o cuidador. El vínculo que señalamos acerca de la relación de acecho delincuente-víctima, la circunstancial u oportunística (juegos, sueños, detención, etc.), dejando en lugar de excepción a los mentados impulsos.

C. SIGNOS BIOLÓGICOS DE LA VIRGINIDAD.

Son signos que tratan de demostrar la virginidad biológica. Tienen un valor negativo exclusivamente puesto que su ausencia significa que la mujer no ha tenido antes ninguna cópula carnal en cambio si es positivo indica la realización anterior del coito pero no su número ni antigüedad.

Estos signos pueden ser de tres tipos:

1. Reacción de Binet. Es una reacción de desviación del complemento que trata de demostrar la presencia de anticuerpos espermatotóxicos en el suero, que aparecerían poco después del primer coito. Es una reacción poco constante y de técnica delicada.

2. Modificación del punto isoeléctrico del suero de la mujer (ULES).

3. Reacción del SCA (spermatozoa coating antigen). Es la detección del antígeno de revestimiento del espermatozoide. Es mucho más fiable; son reacciones tan sensibles que la presencia de plasma seminal en la vagina y en los genitales externos de la mujer puede ser reconocida varios días después de realizarse el coito. Se puede demostrar la reacción antígeno-anticuerpo por inmunofluorescencia, fijación del complemento y hemoaglutinación. Este antígeno procede de las vesículas seminales.

Signos generales

1. La presencia de espermatozoides o semen en los genitales femeninos. Solo es válido en los exámenes precoces, por lo que su estudio debe hacerse lo antes posible. Se demuestra por las técnicas para la identificación de las manchas espermáticas. Hay que recordar que los tocamientos impúdicos (con el pene) pueden dar lugar a la eyaculación *ante portam*, incluso con penetración del semen en la vagina.

2. Presencia de pelos púbicos o genitales del agresor en la víctima. También se debe investigar en el presunto inculpaado.

3. Estudio de un posible contagio venéreo. Su comprobación en la víctima, exige el examen del inculpaado. También se puede presentar en un intento de violación no consumado en tocamientos impúdicos con el pene o por causas ajenas a todo hecho delictivo.

4. Fecundación coincidente con la fecha posible de la violación. Hay que tener en cuenta la posibilidad de una falsa denuncia. Es un signo importante, más hoy en día, ya que la legislación autoriza el aborto.

COITO BUCAL O FELLATIO

Es una manifestación parafetichista, homo o heterosexual, que se manifiesta mediante el contacto de la boca o lengua con el pene.

En esta forma la intimidación es la base de su producción, no suele haber lesiones en la víctima y en algunas ocasiones estas se producirían en el agresor, pudiendo servir para en diagnóstico si existen mordeduras en el pene.

TOCAMIENTOS IMPÚDICOS

Comprende los realizados sobre los órganos genitales de las víctimas.

1. En los niños, las maniobras masturbatorias las realiza la mujer, que una vez conseguida la erección del pene, se lo introduce en la vagina. No suele dejar huellas ni lesiones.
2. En las niñas, suelen ser realizadas por hombres adultos, ya sea con los dedos, pene u otros objetos. Pueden presentar lesiones.

COITO ANAL

El coito anal puede realizarse tanto sobre el hombre como sobre la mujer. En este último caso se habla de sodomización.

Es activo el sujeto que lo realiza y pasivo quien lo tolera. Puede hacerse con niños hombres y mujeres.

LESIONES QUE SE ENCUENTRAN EN EL ATENTADO PEDERÁSTICO AGUDO

1. Lesiones locales (anorrectales). Dependen de la violencia con que se ha realizado el acto sexual y la desproporción de volumen entre las partes anatómicas. Las lesiones van desde excoriaciones leves hasta roturas del esfínter anal. Hay una parálisis del esfínter anal con dilatación de este orificio y una disposición en embudo del ano.
2. Lesiones a distancia. Señala la violencia con que se llevó a cabo el atentado. Se trata de lesiones extraanales, localizadas en las partes genitales y regiones circunvecinas y también a distancia. Consisten en arañazos, rasguños, excoriaciones, equimosis y heridas.
3. Demostración del semen en la ampolla rectal (signo patognomónico). Es el signo más demostrativo y único cuando hay ausencia de lesiones anales. Se lleva a cabo practicando un enema de limpieza y posterior investigación de líquido.
4. Contaminación venérea.

CRÓNICO REPETITIVO

Sólo tiene valor diagnóstico la eventual existencia de esperma anorrectal y la contaminación venérea, ya que los antiguos signos de la pederastia pasiva descritos por Tardieu (deformación infundibular o anus infundibular, relajación del esfínter, formaciones de excrecencias, crestas o mariscos, y estado inflamatorio crónico de la mucosa anal) carecen en realidad de todo valor²⁴.

3.2. PERITACIÓN MÉDICA

La peritación médica se debe realizar a partir del examen de la víctima, del victimario y del escenario de los hechos

EXAMEN DE LA VÍCTIMA

La definición mas completa de victima aparece formulada por la ONU (1985): "victima es aquella persona que ha sufrido un perjuicio como consecuencia de una acción u omisión que constituya un delito..."²⁶.

Los profesionales de la salud que tienen a su cargo el examen de la victima pueden auxiliarse de los protocolos que para este efecto existen en las instancias de justicia, además de las publicaciones que todos los días se dan a conocer a nivel mundial, pero ante todo dirigir su trato de forma respetuosa y comprensiva⁵⁶.

El procedimiento a seguir en caso de ataque sexual es el siguiente:

1. Informar de inmediato a la agencia del Ministerio Publico de la jurisdicción.
2. La victima debe examinarse inmediatamente.
3. Obténgase permiso escrito, con testigos para los pasos siguientes.

Examen físico.

Obtención de especímenes.

Fotografías²⁷.

Para llevar a cabo este examen, el médico forense debe contar con los siguientes elementos:

- a) Orden judicial específica para estudio por este tipo de delito.
- b) Consentimiento informado de la víctima o de su representante legal.
- c) Presencia de una enfermera o de otro funcionario judicial durante la realización del examen.

El examen medicolegal comprende:

- Interrogatorio.
- Inspección.
- Examen de las lesiones.
- Muestras para laboratorio.
- Evaluación psicopatológica forense³.

Interrogatorio

El interrogatorio es importante porque orientará el resto del estudio médico. Interesa saber:

1. Cuándo ocurrió el hecho. La fecha y hora exacta, si fue día festivo o laborable, de principio o fin de semana.

2. Cómo se llevó a cabo el hecho. La manera en que fue llevada la víctima al escenario, las características de la relación sexual (vaginal, anal, o ambas sucesivamente), si fue obligada al coito bucal, a masturbar al agresor o a adoptar posiciones sexuales o sometida a cunilinguo; si fue amenazada con armas u otra forma de intimidación, golpeada o atada; si se le suministró alguna bebida, inyección o comprimido, etcétera.

3. Dónde tuvo lugar el hecho (hotel, casa y su ubicación; vía pública, parque, potrero, edificio, automóvil, etcétera).

4. Quién o quiénes la agredieron (conocidos o desconocidos), relación con la víctima (ascendiente, descendiente, colateral, novio, ex novio, amante, ex amante). En uno u otro caso se debe dar información acerca de sus características físicas y psíquicas y aclarar si la víctima podría reconocerlo.

5. Por qué. Se refiere al móvil que impulso al agresor. En ocasiones éste lo expresa a la víctima mientras lleva a cabo el hecho (culpa a la sociedad, odio contra las prostitutas, etcétera)².

Inspección

Interesa el tipo constitucional, la estatura, el peso, desarrollo músculo esquelético y genital, actitud, gestos, lesiones en la piel, orden o desorden de cabellos y maquillaje, y daño en las ropas (si son las mismas que llevaba al ser asaltada).

La actitud puede ser normal, deprimida, angustiada, indiferente. El tipo constitucional (normolíneo, brevilíneo, longilíneo, u otra clasificación) , correlacionado con el desarrollo muscular, puede dar indicios acerca de la veracidad de la historia de incapacidad para resistir la agresión.

Examen de las lesiones

Para este objetivo, se divide el cuerpo en tres áreas: genital, paragenital y extragenital.

- Área genital. Comprende los genitales externos, la región anorrectal y la zona triangular entre ambas, llamada periné.
- Área paragenital. Está representada por la superficie interna de los muslos, las nalgas y la parte baja de la pared anterior del abdomen.
- Área extragenital. Es la porción restante de la superficie del cuerpo. Interesan, sobre todo, el cuello, las mamas, las muñecas y los tobillos.

Anatomía genital femenina

Los genitales de la mujer presentan tres partes fundamentales; vulva himen y vagina (ver figuras 3 y 4).

La vulva tiene una forma oval. Limita hacia arriba con la pared anterior del abdomen, hacia abajo con el periné, y hacia los lados con los muslos. Comprende el monte de Venus, labios mayores, labios menores, vestíbulo, meato urinario y clítoris.

El monte de Venus es una prominencia redondeada, de tejidos suaves, sobre la sínfisis del pubis, que en la pubertad se cubre de vello.

Los labios mayores son dos rodetes de piel por dentro de los cuales están los labios menores; éstos son dos repliegues membranosos que al llegar al clítoris se dividen en ramas: Una que pasa por encima para constituir el capuchón y otra por debajo que constituye el frenillo.

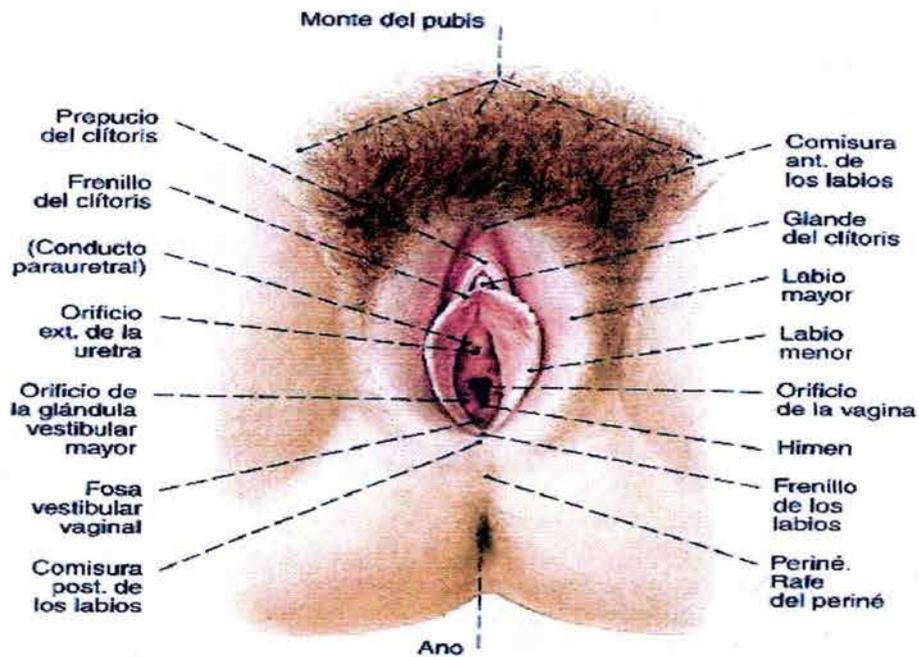
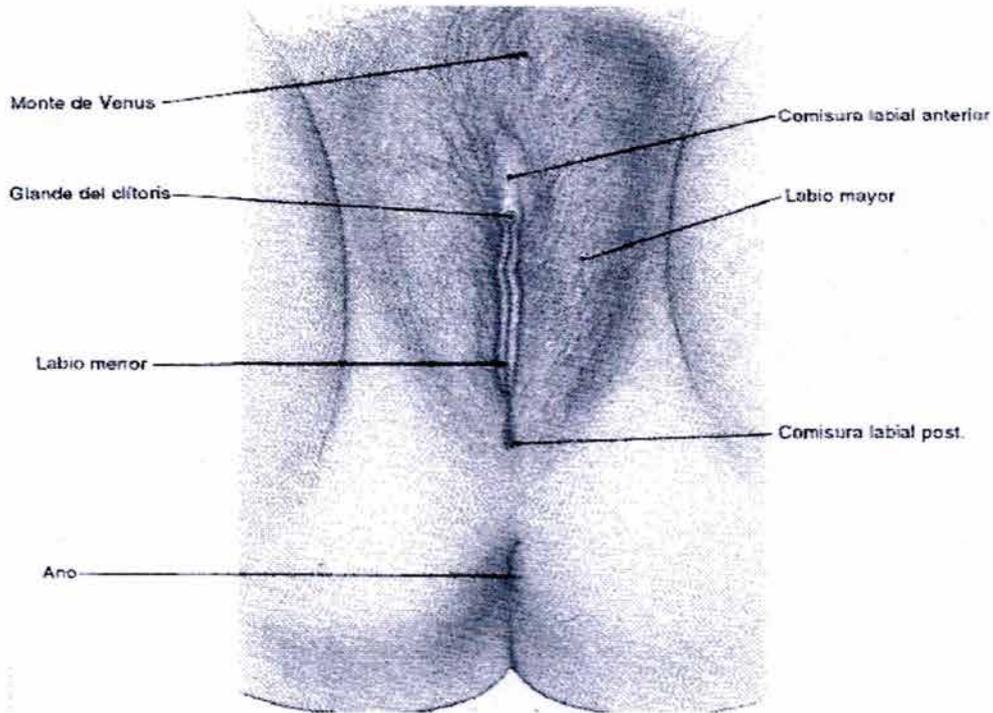
Clítoris. Homólogo del pene, es una formación, eréctil, con un glande, un cuerpo y dos raíces de implantación en el pubis.

En la porción inferior de la vulva está la hendidura o conducto vulvar, que de adelante hacia atrás presenta el vestíbulo, el meato urinario y el clítoris.

Himen. Es una membrana que se halla interpuesta entre la vulva y el orificio inferior de la vagina. En la mujer de pie está horizontal, y en la mujer en decúbito dorsal queda vertical. Tiene un borde periférico de inserción y un orificio hacia la porción central para la salida de la sangre menstrual. Posee un estroma de tejido conjuntivo fibras elásticas y pequeños vasos sanguíneos, y esta revestido por epitelio pavimentoso estratificado en la cara vulvar, la cara vaginal y el borde del orificio. La consistencia del himen oscila desde el que se distiende al paso del pene o de dos dedos del examinador, para retornar el diámetro normal al retirarlo, hasta el himen de estructura fibrosa cartilaginosa e incluso ósea.

Vagina. Es un tubo constituido por una pared muscular revestido por una capa mucosa interna y por una capa fibrosa externa. Los músculos son lisos, involuntarios, y estriados voluntarios. Estos últimos conforman tres anillos, cuya contracción anormal se denomina vaginismo. De acuerdo con sus dimensiones las vaginas pueden ser normales (6.5-7 cm), largas (de 12 a 14 cm) y cortas (de 4 a 5 cm). Por su extremo superior, la vagina recibe el cuello del útero y por su extremo inferior se continúa con la vulva²⁸.

Genitales externos de la mujer ⁴⁷



Visión caudal de los genitales femeninos externos. El vestíbulo de la vagina solo se puede ver si se separan los labios mayores y menores con espátulas o digitalmente (no dibujadas)⁴⁸.

Semiología medicolegal de la vía genital femenina

Para el examen medicolegal de los genitales femeninos, la mujer debe ser explorada en una mesa ginecológica. Acostada sobre la espalda, sus nalgas deben quedar algo por fuera del borde anterior de la mesa; los miembros inferiores flexionados en las rodillas, con los pies apoyados en los estribos, y los muslos separados para exponer el área genital.

El examinador dispondrá los dedos pulgar e índice de la mano izquierda en "U" invertida, a fin de separar los labios mayores, mientras apoya la palma de la mano sobre el monte de Venus.

En el caso de las niñas, es aconsejable que la menor acostada en la mesa, flexione y separe los muslos sobre el abdomen y las piernas sobre aquellos.

Como métodos auxiliares pueden citarse el himeneoscopio y el colposcopio. El primero consiste en un manguito inflable que una vez introducido por el orificio del himen, se insufla y empuja la membrana hacia el frente. El colposcopio es útil para demostrar lesiones que a simple vista no son comprobables, como en casos de penetración incompleta.

Los objetivos del examen de los genitales externos femeninos son los que a continuación se señalan:

- a) Recolección de pelos, fibras, manchas y otros indicios en la vulva.
- b) Descripción de lesiones en la vulva.
- c) Descripción de la condición del himen.
- d) Descripción de las lesiones y recolección de indicios en la vagina.

Semiología de la vía anal.

Debe recordarse que el ano es parte del área genital, para efectos medicolegales. Anatómicamente, el ano es considerado como un conducto muscular de 1.4 a 2 cm de largo. Su parte superior se llama línea anorrectal y pasa por el borde libre de las válvulas semilunares del recto. La parte inferior se denomina línea anoperineal y está a 1.5 o 2 cm debajo de la superior.

Al examen, el ano se presenta como una hendidura anteroposterior en cuyo contorno convergen, en forma radiada, cierto número de pliegues llamados pliegues radiados. Al ser dilatado adquiere una forma circular y los pliegues se borran. La piel que rodea al orificio anal es más fina, más rosada y lisa, y desprovista de pelos, que la de las partes vecinas; se llama margen del ano.

Técnica de examen. Se coloca al paciente de rodillas sobre la mesa de examen, con el tronco y la cabeza más bajos que las nalgas, que pueden ser separadas por las manos del mismo paciente. En la descripción de las lesiones se seguirá el orden de la carátula del reloj, de igual forma que se realiza para el himen.

Aspectos medicolegales del ano.

Interesa establecer si hay signos de violencia reciente o de coito anal habitual.

Como signos de violencia reciente pueden citarse:

- a) Desgarro triangular en hora 6.
- b) Desgarros de algunos de los pliegues anales.
- c) Desgarros recto perineales.
- d) Hemorragia en desgarros de paredes anorrectales o perineales.

Como signo de coito anal habitual.

El único criterio actualmente admisible como sugestivo son las cicatrices antiguas en el ano. Otros signos a los que los textos tradicionales atribuían el carácter de indicadores de pederastia, el ano infundibuliforme y el borramiento de los pliegues radiados, la piel anal hiperqueratótica y la eversión mucocutánea, han perdido valor medicolegal. El ano infundibuliforme es tan poco frecuente que se duda de su existencia y, a lo sumo, se le considera una variante anatómica, lo mismo que el borramiento de pliegues radiados. La piel anal hiperqueratónica, plateada, brillante, puede verse en caso de hemorroides y de oxiuriasis. En cuanto a la eversión mucocutánea, se observa en el estreñimiento crónico severo (Knight).

Examen físico de las áreas paragenital y extragenital

El área paragenital se refiere al periné, la pared abdominal anterior en su tercio inferior, las nalgas y la cara interna de los que pueden mostrar contusiones (excoriaciones, equimosis, hematomas y hasta heridas contusas).

En el área extragenital debe buscarse contusiones en piel cabelluda, hematomas y excoriaciones en rostro, cuello, tórax; sugilaciones y mordeduras en cuello y mamas; hematomas en pared abdominal, muslos, rodillas y piernas, así como signos de compresión toracoabdominal. Algunos autores hacen énfasis en las marcas de ataduras recientes por juegos sexuales a los que la víctima pudo ser sometida, y a la presencia de cicatrices que corresponden a tentativas suicidas antiguas o a farmacodependencia, que demuestren inestabilidad emocional y expliquen falsas denuncias³.

En los casos de violación-homicidio la revisión del cuerpo y la autopsia nos daran indicativos del delito. El consentimiento o no al acto sexual será posible determinarlo solo cuando el cuerpo muestra huellas de violencia o forcejeo; la penetración sexual podrá ser evidenciada por las lesiones o desfloramiento, cuando existan, o por la presencia de semen o trazas seminales en la vagina, recto o boca, sin embargo hay que recordar que para que exista el delito no es necesaria la penetración completa o la eyaculación; el estado general del cuerpo, la posición, el desorden de la ropa o el lugar pueden darnos también datos de la forma en como ocurrieron los hechos²⁹.

LESIONES PSÍQUICAS

Son los daños emocionales que sufre el sujeto pasivo producidos tanto por el hecho mismo de la cópula impuesta, como por las implicaciones familiares y sociales que rodean a la víctima de una violación. En muchos casos de violación a niños y niñas, estos no recuerdan el acto de la violación, ni al violador (que pudo haberlos tratado con cariño y delicadeza) pero sí recuerdan el drama familiar que rodeó al hecho, al que mantienen en la memoria como "algo" doloroso y vergonzoso para ella o él, de lo que se desprende la importancia de un adecuado manejo de los casos de violación, sobre todo tratándose de menores, para no ocasionar mayores males de los que la violación produjera²².

3. 3. EXAMEN DEL ACUSADO

De manera similar a lo que ocurre con La víctima, para proceder al examen medico legal del presunto violador debe existir una orden judicial y el consentimiento informado de aquél.

Dicho estudio pretende determinar los siguientes aspectos:

- a) Capacidad de erección.
- b) Fuerza física para vencer a la víctima.
- c) Signos de coito reciente.
- d) Signos de coito reciente efectuado con violencia.
- e) Signos que lo vinculen con el delito investigado.

Para cumplir con esos objetivos, es necesario seguir el procedimiento que se detalla a continuación:

- Examen físico.
- Muestras para laboratorio.
- Evaluación psicopatologica.

Examen físico

Comprende signos generales y signos especiales.

Signos generales. Son el tipo constitucional, estatura, peso, talla, desarrollo musculoesquelético y desarrollo genital, actitud y facies. En las ropas y la piel, interesa la presencia de fibras manchas y pelos.

Signos especiales. Consisten en el examen de las tres areas corporales mencionadas en ocasión del estudio de la víctima: área genital, área paragenital y área extragenital.

Anatomía genital masculina.

Descrita en el apartado 1 del presente.

Semiología medicolegal del pene

Mediante la retracción del prepucio, se debe descubrir el glande y el surco balanoprepucial, con el fin de buscar lesiones o cuerpos extraños. El cuerpo del pene debe exprimirse y observar si por el meato urinario hay secreción o semen de eyaculación reciente, así como para obtener material que permita el estudio bacteriológico por enfermedades de transmisión sexual.

En el área genital interesa:

1. Capacidad de erección.
2. Signos de coito reciente.
3. Signos de coito reciente con violencia.

Signos de coito reciente. Consisten en la presencia de células vaginales, detectadas mediante la técnica citológica del Papanicolaou; sangre de características serológicas iguales a los de la víctima (grupo, tipo y características topográficas; por ejemplo, sangre menstrual), flujo del semen a la expresión del cuerpo del pene; tricomonas y otros agentes frecuentes en las vías genitales femeninas.

Signos de coito con violencia. Los signos pueden encontrarse en el glande (edema inflamatorio, contusiones, sangre o ruptura del frenillo), herida contusa en prepucio, inflamación de este y cuerpos extraños en el surco balanoprepucial, manchas de sangre de la víctima, materia fecal.

Los Signos que vinculan al acusado con el delito pueden también ser localizados en las otras áreas. De ellos son importantes las lesiones que la víctima

puede haber causado al defenderse de la agresión (estigmas ungueales en cuello y manos, mordedura en miembros superiores o en el pecho).

Muestras para laboratorio

Las muestras que se suministran al laboratorio tienen por objetivo establecer:

- b) Signos de coito reciente.
- c) Grupos sanguíneos de la víctima y del presunto violador.
- d) Enfermedades de transmisión sexual preexistentes.
- e) Fibras y pelos correspondientes a la víctima y al lugar del hecho.
- f) Tóxicos.

Evaluación psicopatológica

El estudio psicopatológico del violador tiene dos objetivos principales

- a) Establecer su grado de imputabilidad.
- b) Aclarar la psicodinamia de su acción³.

Respecto al primer objetivo Achaval afirma "solo la apreciación y el estudio de una personalidad muy patológica podrán permitir la discusión sobre si pudo comprender la criminalidad del acto o si pudo perder la capacidad de dirigir sus acciones"⁶.

Por ejemplo los delirios y alucinaciones son una de las causas aducidas por los esquizofrenicos al justificar su actuación, los delirios de contenido sexual aparecen en delitos contra la libertad sexual, especialmente violaciones; La

responsabilidad criminal de los esquizofrénicos en cualquiera de sus formas, si actúa en plenitud de la actividad morbosa, es causa de inimputabilidad según lo dispuesto en la legislación.

La ausencia de responsabilidad se justifica por la grave perturbación que se sufre, que como se ha descrito versa sobre alucinaciones de todo tipo, en las cuales se ven imágenes inexistentes y se oyen voces irreales que dan ordenes en ocasiones imperativas para cometer el delito³⁰.

En cuanto a la psicodinamia existen varias clasificaciones referentes a la violación y al violador. Sobre el agresor Gebhard y colaboradores (1965) han descrito dos categorías de violadores:

- Violadores para quienes la agresión es un medio para llegar a un fin, de manera que no emplean más fuerza que la necesaria a ese propósito (generalmente el coito).
- Violadores para quienes la violencia es el fin mismo o al menos una meta secundaria. En estos casos, la mujer o, en general, la víctima, es sometida a más fuerza de la necesaria o se le maltrata una vez que la actividad sexual ha concluido³.

En los casos donde el acusado es una persona conocida por la víctima, (novios o maridos) el trato hacia este, debe ser igual que en el caso de violador desconocido, la comprobación del delito suele ser difícil, pues una creencia errónea pero difundida al respecto asegura que el aceptar estar en una relación de este tipo, implica en sí, aceptar el contacto sexual.

En el marco internacional se está dando un aumento exponencial en el número de denuncias que se refieren a este tema, lo que causa alarma y espanto, lo cierto es, que no hay, propiamente, un aumento de casos, pero las víctimas ven hoy mayores posibilidades de ser escuchadas⁵⁷.

3. 4. EXAMEN DEL ESCENARIO

La investigación del escenario tiene por objetivos recolectar indicios para:

- a) Confirmar la comisión del delito.
- b) Determinar la forma en que fue realizado.
- c) Establecer la vinculación del acusado con el hecho.

Al igual que en otras escenas, se establecerán:

Signos generales. Orden, desorden; ubicación probable de los protagonistas; posibilidad de que los gritos de auxilio de la víctima pudieran haber sido escuchados por terceros, etcétera.

Signos especiales. Manchas de semen, sangre y saliva en sábanas, suelo, césped o plantas; presencia de pelos y trozos de ropa; preservativos, etcétera.

Por consiguiente, las muestras pueden ser criminalísticas, inmunohematológicas, y toxicológicas³.

Por las implicaciones que tiene este tipo de delito, el sistema jurídico se encuentra con el problema de dar una respuesta a una sociedad en constante cambio en su sexualidad y relaciones humanas, que planteaba un conflicto en la esencia misma de los conceptos clásicos de los delitos sexuales, la libertad libremente asumida pasa a ser considerada un derecho de la persona y se hace necesario un cambio radical en el marco legislativo; los tribunales son un reflejo de la sociedad donde ésta proyecta su concepción del mundo y de la sexualidad (Ruiz 1991).

Desde dicha perspectiva, la agresión sexual puede ser entendida como la eliminación de un derecho individual, lo que, sin duda pone a la persona que la realiza en una situación social susceptible de ser castigada²⁶, todo esto nos lleva a analizar las leyes que sancionan estos delitos, y a su vez, defienden los derechos de las víctimas, teniendo además el propósito de ser un medio de prevención, ya que advierte a presuntos futuros agresores de la implicación y castigo legal al que estarían sujetos al cometer un delito de esta naturaleza.

4. LEGISLACIÓN VIGENTE A JULIO DE 2003.

La violencia sexual incluye situaciones tales como la prostitución, el turismo sexual, la violación, el tráfico de mujeres y en ciertas culturas ajenas a esta región. las mutilaciones sexuales y el comercio de novias⁵⁴.

La violación es un delito penal y debe ser denunciado como cualquier otro. Sin embargo pocas son las agresiones sexuales que llegan a notificarse. Entre las razones por las que las víctimas optan por guardar silencio se encuentran el pensar que la policía no va a hacer lo suficientemente comprensiva, o porque tienen vergüenza o miedo de la publicidad.

La mujer también puede sentirse culpable y responsable por el ataque y el hecho de que no pudo evadir la situación. Con frecuencia también los agresores amenazan con vengarse si la víctima se lo cuenta a alguien, aunque raramente llevan la amenaza a la práctica.

La víctima puede temer perder su empleo o sus amigos si el violador tiene una posición de poder y respeto⁵⁸.

Todo esto justifica la creación de leyes y sentencias para los delitos de índole sexual. La elevada incidencia de violencia en contra de las mujeres de todo el mundo ha puesto en entredicho el papel de los gobiernos en promover los derechos humanos y las libertades fundamentales de la mujer, y en general de las víctimas.

El punto crucial al evaluar los esfuerzos gubernamentales por eliminar la violencia es determinar el grado en que se aplican las leyes⁵⁹.

CODIGO PENAL FEDERAL
TITULO DECIMO CUARTO

Delitos contra la economía pública

CAPITULO III

Juegos prohibidos

Artículo 259 Bis.- Al que con fines lascivos asedie reiteradamente a persona 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 multa (salario mínimo vigente). 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.

TITULO DECIMO QUINTO

Delitos contra la Libertad y el Normal Desarrollo Psicosexual

CAPITULO I

Hostigamiento sexual, abuso sexual, estupro y violación

Artículo 260.- Al que sin el 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 pena de seis meses a cuatro años de prisión.

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

Artículo 262.- Al que tenga cópula con 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 elemento o 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.
Este delito se perseguirá por querrela de la parte ofendida.

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 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 el máximo de la pena se aumentará hasta en una mitad.

Artículo 266 Bis.- Las penas previstas para el abuso sexual y la violación se aumentará 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 por 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 circunstancia que ellos le proporcionan. Además de la pena de prisión el condenado será destituido del cargo o empleo o suspendido por un termino de cinco años en el ejercicio de dicha profesión;
- IV. El delito fuere cometido por la persona que tiene al ofendido bajo su custodia, guarda o educación o aproveche la confianza en él depositada.

NUEVO CODIGO PENAL PARA EL DISTRITO FEDERAL

TITULO QUINTO

Delitos contra la libertad y la seguridad sexuales y el normal desarrollo psicosexual

CAPITULO I

VIOLACIÓN

ARTICULO 174. Al que por medio de la violencia física o moral realice cópula con persona de cualquier sexo. se le impondrá prisión de seis a diecisiete años.

Se entiende por copula, la introducción del pene en el cuerpo humano por vía vaginal, anal o bucal.

Se sancionara con la misma pena antes señalada, al que introduzca por vía vaginal o anal cualquier elemento, instrumento o cualquier parte del cuerpo humano, distinto al pene, por medio de la violencia física o moral.

Si entre el activo y el pasivo de la violación existiera un vínculo matrimonial, de concubinato o de pareja, se impondrá la pena prevista en este articulo, en estos casos el delito se perseguirá por querrela.

ARTICULO 175 Se equipara a la violación y se sancionará con la misma pena. al que:

- I. Realice cópula con persona menor de doce años de edad o con persona que no tenga la capacidad de comprender el significado del hecho o por cualquier causa no pueda resistirlo; o

- II. Introduzca por vía anal o vaginal cualquier elemento, instrumento o cualquier parte del cuerpo humano distinto del pene en una persona menor de doce años de edad o persona que no tenga capacidad de comprender el significado del hecho, o por cualquier causa no pueda resistirlo.

Si se ejerciera violencia física o moral, la pena prevista se aumentará en una mitad.

CAPITULO II ABUSO SEXUAL

ARTICULO 176. Al que sin consentimiento de una persona y sin el propósito de llegar a la cópula, ejecute en ella un acto sexual, la obligue a observarlo o la haga ejecutarlo, se le impondrá de uno a seis años de prisión.

Si se hiciere uso de violencia física o moral, la pena prevista se aumentará en una mitad.

Este delito se perseguirá por querrela, salvo que concurra violencia.

ARTICULO 177. Al que sin el propósito de llegar a cópula ejecute un acto sexual en una persona menor de doce años 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 observar o ejecutar dicho acto, se le impondrán de dos a siete años de prisión.

Si se hiciere uso de violencia física o moral, la pena prevista se aumentará en una mitad.

ARTICULO 178. Las penas previstas para la violación y el abuso sexual, se aumentarán en dos terceras partes, cuando fueren cometidos:

- I. Con intervención directa o inmediata de dos o más personas;
- II. Por ascendiente contra su descendiente, éste contra aquél, el hermano contra su colateral, el tutor contra su pupilo, el padrastro o la madrastra contra su hijastro, éste contra cualquiera de ellos. amasio de la madre o del padre contra cualquiera de los hijos de éstos o los hijos contra aquellos. 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, así como los derechos sucesorios con respecto del ofendido;

- III. Por quien desempeñe un cargo o empleo público o ejerza su profesión, utilizando los medios o circunstancia que ellos le proporcionen. Además de la pena de prisión, el sentenciado será destituido del cargo o empleo o suspendido por el término de cinco años en el ejercicio de dicha profesión;
- IV. Por la persona que tenga al ofendido bajo su custodia, guarda o educación aproveche la confianza en ella depositada;
- V. Fuere cometido al encontrarse la víctima a bordo de un vehículo particular o de servicio público; o
- VI. Fuere cometido en despoblado o lugar solitario.

CAPITULO III

HOSTIGAMIENTO SEXUAL

ARTICULO 179. Al que acose sexualmente con la amenaza de causarle a la víctima un mal relacionado respecto a la actividad que los vincule, se le impondrá de seis meses a tres años de prisión. Si el hostigador fuese servidor público y se aprovechara de esa circunstancia, además de la pena prevista en el párrafo anterior, se le impondrá destitución por un lapso igual al de la pena de prisión impuesta. Este delito se perseguirá por querrela.

CAPITULO IV

ESTUPRO

ARTICULO 180. Al que tenga cópula con persona mayor de doce y menor de dieciocho años, obteniendo su consentimiento por medio de cualquier tipo de engaño, se le impondrá de seis meses a cuatro años de prisión. Este delito se perseguirá por querrela.

CAPITULO V

INCESTO

ARTICULO 181. A los hermanos y a los ascendientes o descendientes consanguíneos en línea recta, que con conocimiento de su parentesco tengan cópula entre sí se les impondrá prisión o tratamiento en libertad de uno a seis años.

NUEVA LEY DE ATENCIÓN Y APOYO A LAS VÍCTIMAS DEL DELITO PARA EL DISTRITO FEDERAL

CAPITULO II

De la víctima y del ofendido del delito

Artículo 7.- Se entiende por víctima a la persona que haya sufrido daño, como consecuencia de acciones u omisiones realizadas en su contra, tipificadas como delito y sancionadas por la legislación penal.

Artículo 8.- Se entiende por ofendido al titular del bien jurídico lesionado o puesto en peligro que asume la condición de sujeto pasivo del delito.

Artículo 9.- La calidad de víctima o de ofendido, es independiente de que se identifique, aprehenda, enjuicie o condene al responsable del delito y de cualquier relación de parentesco que exista con él; por tanto, la víctima o el ofendido gozarán sin distinción alguna, de las mismas garantías, derechos, protección, asistencia, atención y demás que esta ley señale.

Artículo 10.- Se entiende por daño las lesiones, físicas o mentales, o la pérdida patrimonial de cualquier naturaleza, como consecuencia de un delito.

TITULO SEGUNDO

CAPITULO I

De los derechos de las víctimas y de las obligaciones de las autoridades.

Artículo 11.- Las víctimas o los ofendidos por la comisión de un delito tendrán derecho, en cualquier etapa del procedimiento, según corresponda:

- I. A ser enterados oportunamente de los derechos que en su favor establece la Constitución y, cuando así lo soliciten, ser informados del desarrollo del procedimiento penal y de las consecuencias legales de sus actuaciones dentro del mismo;
- II. A que el Ministerio Público y sus Auxiliares les presten los servicios que constitucionalmente tienen encomendados con legalidad, honradez, lealtad, imparcialidad, profesionalismo, eficiencia, eficacia y con la máxima diligencia;

- III. A que los servidores públicos los traten con la atención y respeto debido a su dignidad humana, absteniéndose de cualquier acto u omisión que cause la suspensión o deficiencia de dicho servicio, abuso o ejercicio indebido de la autoridad;
- IV. A que se les procure justicia de manera pronta, gratuita e imparcial respecto de sus denuncias o querellas, practicando todas las diligencias necesarias para poder integrar la averiguación previa;
- V. A recibir asesoría jurídica gratuita por parte de la Subprocuraduría, respecto de sus denuncias o querellas y, en su caso, ser auxiliados por interpretes traductores cuando pertenezcan a un grupo étnico o pueblos indígenas, no conozcan o no comprendan bien el idioma español, o padezcan alguna discapacidad que les impida oír o hablar;
- VI. A contar con todas las facilidades para identificar al probable responsable;
- VII. A recibir en forma gratuita copia simple de su denuncia o querella, ratificada debidamente o copia certificada cuando la solicite, de conformidad con lo previsto por el Código Procesal y por el Código Financiero del Distrito Federal;
- VIII. A comparecer ante el Ministerio Público para poner a su disposición todos los datos conducentes a acreditar el cuerpo del delito, la responsabilidad del indiciado y el monto del daño y de su reparación y a que el Ministerio Público integre dichos datos a la averiguación;
- IX. A tener acceso al expediente para informarse sobre el estado y avance del procedimiento;
- X. A que se les preste atención médica y psicológica de urgencia cuando la requieran;
- XI. A que el Ministerio Público solicite debidamente la reparación del daño y a que se les satisfaga, cuando ésta proceda;
- XII. A recibir auxilio psicológico en los casos necesarios y, en caso de delitos que atenten contra la libertad y el normal desarrollo psicosexual, a recibir este auxilio por una persona de su mismo sexo;
- XIII. A ser restituidos en sus derechos, cuando éstos estén acreditados;
- XIV. A ser informados claramente del significado y de la trascendencia jurídica del perdón en caso de que deseen otorgarlo;
- XV. A la no discriminación, motivada por origen étnico nacional, el género, la edad, las discapacidades, la condición social, las condiciones de salud, la religión, las opiniones, las preferencias sexuales, el estado civil o cualquier otra que atente contra la dignidad humana y tenga por objeto anular o menoscabar los derechos y libertades de las personas, por lo que la protección de sus derechos se hará sin distinción alguna;
- XVI. A ser asistidos en las diligencias que se practiquen por la persona que ejerza la patria potestad, tutela o curatela o, en su defecto, por la psicóloga adscrita, cuando la víctima sea menor o incapaz y comparezca ante el Ministerio Público;

- XVII. A solicitar el desahogo de las diligencias que en su caso, correspondan, salvo que el Ministerio Público considere que no es necesario el desahogo de determinada diligencia, debiendo éste fundar su negativa;
- XVIII. A solicitar las medidas y providencias para proteger su vida, integridad física y moral, bienes, posesiones o derechos, incluyendo los de familiares directos y de los testigos en su favor, contra todo acto de intimidación y represalia, o bien cuando existan datos suficientes que demuestren que éstos pudieran ser afectados por los probables responsables del delito o por terceros implicados; y
- XIX. A ser notificados de todas las resoluciones apelables.

Artículo 12.- Proporcionarán atención y apoyo a las víctimas u ofendidos del delito, en sus respectivos ámbitos de competencia, las autoridades siguientes:

- I. La Procuraduría;
- II. La Secretaría de Salud del Distrito Federal;
- III. El Sistema para el Desarrollo Integral de la Familia en el Distrito Federal,
y
- IV. La Secretaría de Seguridad Pública del Distrito Federal.

Artículo 13.- La Procuraduría proporciona a las víctimas y a los ofendidos de delitos los siguientes servicios:

- I. Asesoría Jurídica gratuita, pronta, imparcial, contando con el apoyo de un asistente jurídico que le asista en todos los actos en que deba intervenir para la defensa de sus derechos;
- II. Atención médica y psicológica de urgencia, pudiendo gestionar aquella que no este en condiciones de proporcionar directamente; o
- III. Solicitar la reparación del daño, en los que ésta proceda.

Artículo 14. La Secretaría de Salud del Distrito Federal y las agencias especiales para la atención de los delitos sexuales, con el fin de lograr el bienestar físico, mental y social otorgará los siguientes servicios:

- I. Atención medica en sus formas preventivas, curativas y de rehabilitación;
- II. Asistencia psicológica
- III. Tratamientos postraumáticos; y
- IV. Atención ginecológica para las victimas de delitos sexuales.

La legislación cambia, en orden mas que en contenido, en cada uno de los lugares. Por ejemplo dentro de la Republica Mexicana los artículos que tratan de los delitos de índole sexual son³¹:

ESTADO	Artículos del C. P. Estatal
Guanajuato	249 – 255
Hidalgo	179 – 190
Jalisco	173 – 176
Edo de México	275 – 282
Michoacán	240 – 246
Nuevo León	259 – 272
Querétaro	160 – 160
Zacatecas	231 – 237

De igual forma, ocurre entre los países, donde las diferencias radican sobre todo en la interpretación de la ley y las sanciones impuestas, algunos ejemplos de los artículos que tratan sobre los delitos de índole sexual en algunos países son³²:

PAIS	Artículos del C. P. del País
Brasil	219 – 226, 269, 272- 276
Bolivia	308 – 309
Argentina	119, 120, 122, 124
Colombia	310, 316, 317
Chile	361 – 163
Cuba	353
Ecuador	59, 510, 512
El Salvador	392, 396
España	429, 434 – 436
Guatemala	330, 232
Honduras	436, 440
Nicaragua	438, 440
Venezuela	375
India	375, 376 <small>bibliografía numero 60</small>

5. ESTUDIO LEGAL DE MANCHAS y HUELLAS DE SEMEN

Desafortunadamente, cada día es mayor el número de delitos contra el pudor cometidos en las grandes urbes; tal situación ha dado origen en la ciudad de México catalogada como la más grande y poblada del mundo, a la creación de una oficina especial que atienda este tipo de ilícitos. Consecuentemente, es de primordial interés contar con una metodología rápida, eficiente y de fácil realización, que resuelva estos casos de suyo tan penosos, como factor determinante en la indagación judicial

Antecedentes históricos

El primer reporte que se tiene de la existencia de las células espermáticas, data del siglo XVII: un estudiante de Danzig llamado Luis de Hamm, en el año de 1667, tuvo la idea de colocar en el microscopio una gota de semen humano y fue quien disfrutó de la primicia del asombroso espectáculo que da, la multitud de espermatozoides que en él pululan; se apresuró a comunicar su descubrimiento al ilustre holandés Anton Van Leeuwenhok, que se encontraba ampliando las observaciones de Malpighi sobre los capilares sanguíneos y después presentaría la primera descripción completa de los glóbulos rojos, quien tuvo el mérito de darse cuenta de su alcance y dedicándose a buscar las células espermáticas en las simientes de los animales (perro, conejo, gallo), los describió minuciosamente comprendiendo que intervenían de una manera decisiva en la generación.

Probablemente los espermatozoides ya habían sido vistos anteriormente por Nicolas Hartsocker, pero su descubrimiento no fue hecho público. Así pues en 1667 el espermatozoide fue visto, identificado y descrito.

El francés Albert Florence, nacido en 1851, 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 Bumell (1859) se observó que las manchas de semen adquirían bajo esa radiación una fluorescencia azulada.

Barberio, 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 fluorescencia y Barberio aun cuando útiles en algunos casos, no son fiables. Sus resultados no son concluyentes ni característicos: positivos, no permiten afirmar la presencia de esperma; negativos, no autorizan a concluir su ausencia.

Fishmall y Lemer en 1953 dan a conocer su método para estimar 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 una técnica para determinar fosfatasa ácida seminal en 1964 en la Revista Forensic Science.

G. M. Willot en 1972, incluye en la misma revista un procedimiento por el cual el ácido L-tartárico inhibe las fosfatasas seminal y vaginal.

Dos años más tarde, Adams y Brian⁴ 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 la presente en secreciones vaginales, así como la procedente de vegetales.

En el año de 1978, Sensabaugh aísla una proteína específica del semen humano: la proteína p-30 y en 1983, describe un procedimiento para su detección por inmunoensayo.

Indudablemente, el paso decisivo en la Serología Forense en las postrimerías de este siglo xx es el descubrimiento del "DNA" celular, 1989, técnica mediante la cual, una vez identificada una muestra de líquido seminal, es posible individualizarla a través de su patrón genético³⁷.

5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN

Es muy importante a la hora de identificar al agresor o agresores por los restos que pueden dejar bien en la víctima o en las ropas de ésta²³. La resistencia física de la víctima puede dar lugar a prensión de trozos del vestido del violador, de cabellos o de restos dérmicos retenidos en una excoriación ungueal, propicios para la identificación del delincuente³³. Ha de iniciarse desde el primer momento y antes de iniciar cualquier tipo de maniobra sobre el cuerpo de la víctima. En caso contrario, el propio perito podría contribuir a la pérdida de elementos de prueba o bien introducir elementos extraños que pudieran generar confusión²⁴.

Con el fin de evitar esa contingencia es aconsejable que la víctima se desvista sobre un papel blanco satinado o sobre una sábana de idénticas características. De esta manera se facilita la recogida de pelos, fibras, tierra o cualquier otro indicio biológico o de otro tipo de interés diagnóstico. Se procederá colocando a la víctima en el centro e indicándole que se desprenda de su ropa, quitándose las prendas de una a una y sacudiéndolas sobre el papel o la sábana. El perito habrá de examinar cada una de esas prendas a la búsqueda de las posibles manchas biológicas (sangre, semen, saliva, etc.) y no biológicas (fibras, tierra, etc.) anotando con detalle todo lo que encuentre. Estas ropas se extenderán sobre una mesa o camilla y se secarán al aire²⁴.

Igualmente deberá inspeccionarse la piel de la víctima, con la finalidad en esta ocasión de la recogida de indicios de tipo biológico.

El uso de una lámpara de luz ultravioleta puede ayudar a la localización de manchas de semen sobre las ropas o superficie corporal puesto que éstas presentan una fluorescencia característica para cada una de ellas. Estas manchas deberán recogerse con un trozo de tela de algodón empapada con agua estéril. El agua del grifo puede utilizarse también si no se dispone de agua estéril pero ha de evitarse de ser posible la solución salina que pueda romper los espermatozoides, aunque no interfiera un estudio posterior de ADN o marcadores genéticos²⁴.

Si las muestras se han recogido con un trocito de tela de algodón es aconsejable siempre dejar que éste se seque al aire antes de introducirlo en un sobre de papel (nunca de plástico, pues favorece la rápida reproducción de hongos) se utilizarán bolsas o sobres de papel independientes para cada indicio. Si se trata de un sobre, al cerrarlo no se ha de humedecer el borde adhesivo con saliva sino que se ha de utilizar un poco de agua, ya que este procedimiento podría interferir en estudios posteriores²⁴.

Lugar de hechos

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

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

En los casos en que la persona ofendida esté viva y en consideración a su estado anímico, la toma de la muestra deberá efectuarse únicamente mediante la intervención de profesionistas altamente calificados y del mismo sexo que la persona agredida, a fin de garantizar absoluta seriedad, discreción y respetabilidad.

El procedimiento consiste en tomar las muestras de la cavidad vaginal y anal, por medio de los hisopos contenidos en los tubos precitados, tomando éstas a la mayor profundidad posible.

Deberán tomarse tres muestras como mínimo:

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

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 o en la Agencia Investigadora; 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 2 ml 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 próximo 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 podremos almacenarlo 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 asignado Como "2", que se destinará para la búsqueda de fosfatasa ácida y su cuantificación, si esta es posible.

a) 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 fe ministerial.

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

- Número de averiguación previa o expediente.
- Fecha y hora en que se recolectó la evidencia.
- Nombre de la persona a quien se le tomó.
- Nombre del investigador que realizó la toma³⁷.

En este momento inicia la cadena de custodia de la muestra, que es el proceso que sigue el indicio desde el lugar de hechos, hasta el escritorio del juez, pasando por el laboratorio, la agencia del ministerio público, garantizando su integridad.

Esto es de vital importancia en el estudio legal o forense de indicios o muestras, ya que de esta integridad depende en gran parte que los resultados obtenidos tengan validez en un dictamen pericial.

Por lo general se vigila el cumplimiento de la cadena de custodia a través de documentos que acompañan a la muestra y que pueden contener entre otros los siguientes datos.

- Los de la etiqueta mencionados anteriormente.
- Artículo número...
- Descripción...
- Donde se encontró
- Recuperada por...
- Foto número...
- Método de empaque
- Notas misceláneas

Y cada vez que el indicio cambiara de lugar

- Nombre, Cargo y Firma de quien entrega
- Nombre, Cargo y Firma de quien recibe
- Hora y/o Fecha del cambio

De tal forma que pueda seguirse con precisión y confiabilidad todos y cada uno de los lugares y personas relacionados con el proceso de la muestra.

5. 2. MANCHAS DE SEMEN

Por mancha se entiende toda modificación de color, toda suciedad o adición de una materia extraña, visible o no, en la superficie del cuerpo humano, sobre instrumentos o sobre un objeto cualquiera, determinada por el depósito de un producto líquido, blando y algunas veces sólido, de cuyo estudio se pueden establecer relaciones de la intervención o participación de una persona o cosa en un hecho delictivo (López, Gómez y Gisbert).

El líquido espermático se puede presentar al investigador en tres formas distintas: como mancha, impregnando un tejido, como fluido, mezclado con otros fluidos corporales como la secreción vaginal, o como semen o líquido espermático. La presencia de esperma en la víctima puede ser el único dato para establecer el diagnóstico de la cópula en una mujer ya desflorada⁴.

Las manchas pueden estar frescas o secas. Es posible encontrarlas en la ropa interior o exterior, así como en la ropa de cama u otros sitios. Cuando el material que dio origen a la mancha está fresco se recoge y coloca en una laminilla de cristal; cuando ya está seco, es necesario recortar el pedazo de tela donde se encuentra el sitio sospechoso para mandarlo al estudio de laboratorio⁵.

Cuando se tienen indicios húmedos lo más importante es dejarlos secar a temperatura ambiente, para evitar favorecer la proliferación bacteriana y fúngica con el ambiente húmedo. Si por cualquier circunstancia no se puede o desea dejarlos secar, la muestra debe congelarse inmediatamente, con lo que se bloquea cualquier acción contaminante por parte de microorganismos.

Hay que tomar la precaución de no almacenar indicios húmedos en contacto con superficies absorbentes, como papeles, cartón, telas, algodón o gasa, ya que puede difundir la muestra y depositarse en otro lugar distinto del original, imposibilitando muchas veces la investigación ulterior y dificultando siempre la interpretación de los resultados.

Las manchas secas pueden ser de cualesquiera de los orígenes ya considerados, debiendo de tomar en cuenta el investigador en este caso sobre qué tipo de soporte se encuentran⁷.

Para su estudio se pondrá la mancha en una solución de cloruro de sodio al 9 por 1,000, varias horas si es necesario; en esta solución se buscarán los espermatozoides o con ella se harán las reacciones respectivas.

Si se obtiene una mancha fresca de la vagina, recto, etc., se llevará ésta al microscopio para buscar los espermatozoides, previa desecación, fijación y coloración¹².

5. 3. EXAMEN MACROSCÓPICO DE LA MANCHA

Debe tener en cuenta:

1) Regiones del hallazgo:

- a) Sobre la víctima: regiones corporales; ropas, colocarlas sobre el cuerpo o maniquí;
- b) Sobre el delincuente: regiones corporales; ropas, colocarlas sobre el cuerpo o maniquí;
- c) En el ambiente: muebles, decorados, paredes, piso, sábanas, líquidos de lavado, esponjas, pañuelos, etcétera⁶.

2) Aspecto de la mancha con luz natural o artificial común:

Sobre la piel al igual que sobre telas de seda forma pequeñas costras o películas; sobre objetos lisos son de color blanco amarillento; sobre tejidos rugosos o con pelos tiene aspecto de "baba de caracol", sin impregnación y con escamas sobre "cada" pelo; sobre tejidos que se impregnan forma las "manchas en mapa", debidas a enjugamiento⁶.

Se puede observar que la morfología de éstas varía según el soporte donde se asienta. En la piel, cuando se deseca, adopta el aspecto de una fina película, como de pegamento, que clásicamente se suele comparar a un «rastro de caracol». Estas manchas deben buscarse tanto en la víctima como en el sospechoso, a nivel de zonas típicas: pubis, cara interna de los muslos, labios mayores, los pelos impregnados tienen un aspecto como engomado.

En los tejidos absorbentes forma unas manchas típicas, con una característica tiesura, como si el tejido estuviera almidonado. Si la mancha es reciente, tiene un olor típico. La morfología de la mancha es irregular, con unos contornos bien delimitados, que han justificado su comparación con «cartas geográficas». No obstante puede haber diferencias según el mecanismo de su producción: si se debe a una eyaculación, se produce una gran zona manchada con su típico aspecto en mapa; si se debe a una limpieza del meato o al enjugamiento del miembro, la mancha no tiene ese aspecto típico.

Es interesante señalar que la difusión de la mancha no se realiza de un modo homogéneo; se produce como un proceso cromatográfico, en el que los elementos celulares no difunden, quedando en el centro de la mancha⁴.

3) Aspectos de la mancha con luz ultravioleta:

Descrita más delante en el apartado de Diagnostico genérico de las manchas de semen.

4) Palpación de la mancha:

En las ubicadas sobre tela la tactación es rugosa y dura.

5) Cantidad:

La cantidad varía como particularidad individual; como frecuencia de las eyaculaciones y tiempo transcurrido entre ellas.

6) Olor:

Sui generis atribuido a la secreción prostática⁶.

5. 4. DIAGNÓSTICO GENÉRICO DE LA MANCHA ESPERMÁTICA.

Hay pruebas de orientación, de presunción y de certeza

5. 4. 1. PRUEBAS DE ORIENTACIÓN

1) Pruebas de orientación cristalográficas.

El extracto de la mancha, unido a determinados reactivos, produce la formación de microcristales, originados por la colina y la espermina, que son productos de descomposición del esperma. Estos derivados faltan en el esperma fresco y en el muy antiguo. Con otras sustancias orgánicas (pus, biliis, etc.), e inorgánicas (extractos vegetales diversos), se obtienen resultados similares.

Estas pruebas no son específicas, y sólo se utilizan como complemento de otras de mayor fidelidad. Las técnicas que se han propuesto son numerosas. Sólo se mencionarán algunas, a modo de ejemplo:

1) *Reacción de Florence:*

Utiliza solución yodo-yodurada y obtiene cristales de colina (rombos color castaño)³⁸.

La reacción de Florence consiste en la formación de cristales bajo la acción del siguiente reactivo: yoduro de potasio 1.65, yodo 2.54, agua destilada 30 c.c. Se coloca en un portaobjetos una gota del macerado sospechoso y se le agregan dos gotas de reactivo, cubriendo la preparación para examinarla al microscopio; si hay esperma, se forman los cristales.

Los cristales de Florence aparecen con frecuencia al instante, sin obedecer a una sola ley, ya que unas veces son voluminosos, otras veces cortos y extremadamente anchos, otros son pequeños, no llegando a alcanzar el tamaño de los cristales de hemina, teniendo en cuenta que casi siempre son mas grandes que éstos.

Son láminas pardoamarillentas, de bordes paralelos, cuyas extremidades tienen ángulos más o menos agudos.

Manchas de otras sustancias orgánicas, (saliva, líquido prostático), dan también los cristales de Florence, por lo que esta reacción no es específica¹².

II) *Reacción de Barberio:*

Utiliza como reactivo una solución saturada de ácido pícrico, para obtener cristales de colina, aconsejándose que la solución esté bien filtrada para evitar toda precipitación de cristal del ácido.

Para efectuar esta reacción se procede como en la de Florence: una gota del líquido a examinar y dos del reactivo de Barberio, se colocan sobre un portaobjetos, obteniéndose cristales de formas diferentes: agujas, conos, los que están adosados por su base y presentando por transparencia aspecto romboideo, cuyos ángulos obtusos serían truncados; a veces son ovoides y entre éstos y los rómbico se observan todos los intermediarios.

Se obtiene también la reacción de Barberio, con jugo de carne, de naranja, con pus blenorragico, entre otras.

Las reacciones de Florence y Barberio al no ser exclusivas para el esperma, no permiten afirmar su presencia; siendo negativas, no se puede tampoco afirmar su ausencia; por lo tanto, su valor probatorio judicial es notoriamente bajo¹².

III) *Reacción de Puranen:* utiliza ácido flaviánico, obtiene cristales de espermina (en "Cruz de San Andes")³⁸.

IV) *Reacción de Guarino:* utiliza trinitro-resorcina, obtiene cristales de espermina (en "esqueleto de ramas de pino", de color amarillo verdoso)³⁸.

2) Prueba de orientación por Luz Ultra-Violeta

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 fin³⁷.

Se usa la luz de Wood o la de Gallois con filtro de cuarzo con óxido de níquel y longitud de onda alrededor de 3,650 Å (380 – 470 nm) y la mancha, en cuarto oscuro, toma una fluorescencia blanco-verdosa sin poder evitar las dudas sobre pus, orina y mucus, pero diferenciables en la fotografía⁶.

Las prendas sospechosas deben ser examinadas a la luz ultravioleta de Wood. Las manchas de esperma dan una fluorescencia blanca-amarillenta, que va ganando amarillo con el tiempo. El examen de fluorescencia permite diferenciarlas de las manchas debidas a otros productos, como orina (fluorescencia celeste), pus, moco o secreción vaginal. Sin embargo, la fluorescencia, a la lámpara de Wood no es específica del esperma también la encontramos en flujo vaginal producido por hongos o bacterias y detergentes biológicos entre otros.

La fluorescencia puede estar ausente si la mancha ha sido tratada con detergente. La actividad de las flavinas decrece con el tiempo aproximadamente 50% cada 24 horas de tal forma que después de 36 horas se observara aproximadamente el 25% de la fluorescencia inicial.

En conjunto se trata de una prueba de gran valor de orientación y localización⁴.

La luz de Wood debe usarse obligatoriamente en todos los delitos contra la libertad sexual y en aquellos en que se sospeche algún componente sexual, aunque algunos cuerpos de policía de otros países lo utilizan sistemáticamente por su sensibilidad en detectar manchas pequeñas (de sangre, semen, orina) invisibles al ojo y a la iluminación normal⁷.

5. 4. 2. PRUEBAS DE PRESUNCIÓN

Están representadas por el "test de la fosfatasa ácida"; sus basamentos son los siguientes:

- I) En el tejido prostático hay cantidades elevadísimas de fosfatasa ácida;
- II) En el resto de los tejidos de la economía no se encuentra esta enzima, o sus proporciones son ínfimas. La técnica se basa en los trabajos originales de King y Armstrong, adaptados a fines médico-legales. La cantidad de fenol liberado por un compuesto de disodio-fenil-fosfato, hidrolizado por la fosfatasa contenida en la mancha, es medida fehaciente de ella. Un valor superior a 50 unidades King-Armstrong puede considerarse como prueba positiva de origen seminal³⁸.

Técnica de la Fosfatasa Ácida

FUNDAMENTO QUÍMICO

Fosfatasa ácida, ACP, monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa (pH óptimo: ácido). Peso molecular: 100,000 daltons (varia con la fuente tisular). Clase química: enzima, glucoproteína. Se han descrito 20 isoenzimas diferentes, la de mayor importancia es la prostática (PAP, isoenzima 2 por electroforesis³⁹).

La fosfatasa ácida está presente en los géneros animal y vegetal; siendo una enzima, tiene la propiedad de hidrolizar los ésteres alifáticos y aromáticos del ácido ortofosfórico.

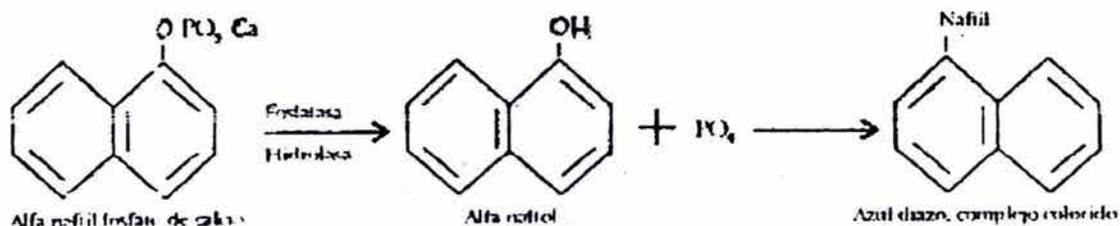
Por lo que se refiere a los fluidos corporales humanos, se ha demostrado que en el líquido seminal se encuentra en concentraciones de 20 a 400 veces más que en los otros fluidos; por lo tanto, la presencia de semen en manchas sospechosas se puede detectar por el hallazgo de elevadas cantidades de fosfatasa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

Así pues, es extraordinariamente importante ajustar los reactivos utilizados para su detección, de manera que solamente se obtenga reacción positiva cuando la enzima precipitada se encuentre en cantidades mayores a 20 unidades.

Su detección se basa en una reacción cromática de la enzima fosfatasa ácida, muy abundante en la secreción genital masculina.

La fosfatasa ácida del esperma reacciona con el reactivo 1-naftilfosfato de calcio y queda libre alfa naftol; éste reacciona con sulfato de dianisiltetrazonio y forma un colorante azoico violeta intenso.

Reacción química de la técnica para detección de Fosfatasa Ácida.



No obstante que está aceptado que solo en el líquido seminal existen altas 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 y plantas³⁷.

Por ejemplo existen valores de referencia para fosfatasa ácida prostática (PAP) y fosfatasa ácida total en suero humano⁴⁰:

Valores de referencia	= ng/mL y unidades
Ácida prostática	Normal : 0.60 – 1.0 ng/ml
Ácida prostática	Normal Unidades Internacionales: <4mU/mL
Ácida total	Normal : 0.5 – 5.0 Unidades King-Armstrong
Ácida total	Normal : < de 1.5 Unidades Bodanski
Ácida total	Normal Unidades Internacionales:< 11 mU/mL

Kinri, Hauck y Leithoff han apuntado la siguiente lista de productos y especímenes que también la contienen:

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

De la observación de la lista anterior, se infiere el por qué la técnica de detección de 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.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución 1 (Buffer)

Cloruro de sodio	23.0 gr
Acetato de sodio 3 H ₂ O	2.0 gr
Ácido Acético glacial	0.5 ml
Agua destilada	90.0 ml

Solución 2

1-naftil fosfato de calcio	50.0 gr
Sulfato de dianisiltetrasonio.....	30.0 gr
Solución acuosa al 10% de lauril sulfato de sodio	1.0 ml

Reunir las soluciones 1) y 2); Filtrar y envasar en frasco ámbar que se guarda en refrigeración a 4° C. Esta solución se conserva activa durante un año.

En virtud de que actualmente ya no se fabrica el sulfato de dianisiltetrasonio, se ha sustituido por el siguiente reactivo:

Solución 1

Orto Dianisidina tetrazotizada 1 gr
Acetatodesodio20 gr
Acido acético10 ml
Agua destilada..... 100 ml

Solución 2

Alfa naftil fosfato de sodio 0.8 gr
Agua destilada 10 ml

Mezclar 10 ml de Solución 1, 89 ml de agua destilada y 1.0 ml de la Solución 2. Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

PROCEDIMIENTO

La mancha problema o el hisopo con el cual se tomó la muestra, se colocan entre dos hojas de papel filtro; lo mismo se hace con material igual no manchado para prueba en blanco y con otro que esté maculado con semen, como testigo positivo.

Se colocan sobre una lámina de vidrio en la que previamente se habrá anotado: Testigo negativo; Muestra problema y Testigo positivo; inmediatamente después se agregan aproximadamente 10 gotas de reactivo a cada una de las muestras, con una pipeta Pasteur.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

La aparición de una coloración violeta intensa en la muestra problema dentro de un tiempo no mayor a 5 minutos, indicará la presencia de fosfatasa ácida en cantidades mayores a 20 Unidades King-Armstrong y por lo tanto la muy probable presencia de semen; en el testigo positivo siempre deberá observarse la intensidad de color arriba señalado, tonalidad que no deberá aparecer en el testigo negativo

Técnica por inhibición de la Fosfatasa Ácida seminal y vaginal, con ácido L-tartárico

Este procedimiento reportado por Willot y revisado por Stone, señala que tanto las fosfatasas seminales como las vaginales son inhibidas por el ácido L-tartárico.

La formación de un precipitado violeta intenso con tamaño de partícula grande, procedente de la fosfatasa ácida seminal, es diferente al precipitado café rojizo con menor tamaño de partícula, de origen NO prostático.

El principio es similar al señalado por la técnica anterior la fosfatasa ácida puede hidrolizar ciertos fosfatos orgánicos en medio ligeramente ácido. El sustrato en este procedimiento es el alfa naftil fosfato de calcio

El alfa naftil se incuba con la muestra problema y con un testigo de semen, ambos a un pH de 4.9; la enzima fosfatasa en caso de estar presente, rompe el radical fosfato liberando el grupo alfa naftol, el cual reacciona con el azul diazo formando un complejo de color violeta. A otro lote igual de muestras, se les añade el sustrato de alfa naftil fosfato, pero ahora adicionado de L-tartárico: si la fosfatasa ácida es de origen prostático, el L-tartrato inhibe la reacción de copulación.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Solución 1 (Buffer de acetatos)

Cloruro de sodio	23.0 gr
Acetato de sodio	2.0 gr
Ácido acético glacial.....	0.5 ml
Agua desionizada	90.0 ml

Disolver perfectamente los reactivos en agua; ajustar el pH a 4.9 y el volumen final a 100 ml con agua desionizada. Envasar en frasco ámbar y guardar en refrigeración

Solución 2 (sustrato)

Alfa naftil fosfato, sal de calcio.....0.30 gr

Colocar los 0.30 gr del reactivo anterior en un frasco gotero color ámbar de 30 ml de capacidad; añadir 20 ml de la Solución 1 (buffer de acetatos), agitar hasta disolución y almacenar en refrigeración, esta solución debe prepararse cada mes, por lo que es conveniente anotar en la etiqueta del frasco la fecha de preparación.

Solución 3 (colorida)

Naftil-diazo azul B 0.3 gr

Solución salina estéril.20.0 ml

Envasar en frasco gotero ámbar. Conservarla en refrigeración y anotar en su etiqueta la fecha de preparación, ya que debe renovarse cada dos meses.

Solución (inhibidor)

Acido L-tartárico 3.0 gr

Hidróxido de sodio 1 N.35.0 ml

Agua desionizada200.0 ml

Disolver el ácido L-tartárico en un poco de agua y agregar los 35 ml de hidróxido de sodio 1N; agitar hasta disolución. Ajustar el pH a 4.9, agregando hidróxido de sodio 1N si el pH es demasiado bajo y ácido L-tartárico si está alto; añadir agua desionizada hasta aforar el volumen a 200 ml.

Almacenar en frasco ámbar en refrigeración, anotando en la etiqueta la fecha de preparación. Esta solución deberá renovarse cada dos meses.

PROCEDIMIENTO

1. Cortar un trozo de 1 X 1 cm del material que contenga la mancha seminal sospechosa; colocarla en un tubo de ensayo con tapón de rosca, de 15 ml de capacidad y añadir 3.0 ml de agua desionizada. Marcar el tubo con la palabra "Problema".
2. Cortar un trozo de 1 X 1 cm de un área que no presente manchas, colocarlo en un tubo igual al de la muestra problema con 3.0 ml de agua. Marcar el tubo "Control".
3. Después de 15 minutos preparar 4 tubos de 7 ml como sigue:
"P" de problema con 3 gotas de sustrato
"Pi" problema inhibidor con 3 gotas de sustrato y 3 gotas de inhibidor
"C" de control con 3 gotas de sustrato
"Ci" control inhibidor con 3 gotas de sustrato y 3 gotas de inhibidor

Agitar cada tubo mezclando bien.
4. Poner 0.3 ml (aproximadamente 10 gotas) del tubo "Problema" a cada uno de los tubos P y Pi. Mezclar.
5. Pasar 0.3 ml del tubo "Control" a los tubos marcados: C y Ci. Mezclar.
6. Agregar tres gotas de la solución de naftil-diazo azul B, a cada uno de los cuatro tubos.

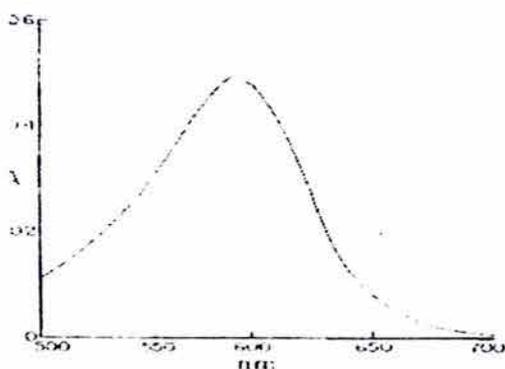
INTERPRETACIÓN

Si el tubo marcador como P cambia de color café marrón a violeta intenso en 30 segundos o menos, mientras que el Pi en el mismo tiempo toma un color amarillo pálido el resultado es positivo. Los tubos C y Ci deben también permanecer de color amarillo claro; si esto no sucede indicará que el reactivo se ha deteriorado; así pues, si el tubo problema cambia a color violeta intenso y este color no aparece en ninguno de los otros tres tubos, el resultado será indudablemente positivo. En ausencia de espermatozoides, esta técnica debe ser corroborada por electroforesis usando suero de semen antihumano para comprobación; siendo además conveniente cuantificar la fosfatasa ácida especialmente cuando se trata de individuos azoospermicos o vasectomizados³⁷.

Determinación cuantitativa de la Fosfatasa Ácida prostática en huellas y manchas de semen

La fosfatasa ácida del suero (al igual que la de origen prostático) hidroliza el monofosfato de timolftaleina a pH 5.9 liberando así timolftaleina. La adición de un álcali interrumpe la actividad enzimática y, simultáneamente, transforma la timolftaleina, incolora en un cromógeno azul que se mide fotométricamente⁴¹.

Esta coloración azul es proporcional a la cantidad de enzima prostática y se



Curva de absorción del color en la determinación de fosfatasa ácida: patron de timolftaleina (21.5 microgramos) frente a agua. Espectrofotómetro Registrador Cary modelo 15.

mide en un espectrofotómetro para inmunoensayo enzimático a 590 nm: la lectura se compara con una curva de calibración previamente elaborada para ese efecto. El instrumento utilizado es un espectrofotómetro ultravioleta visible para inmunoensayo enzimático por ejemplo el de la marca "Civa-Emit".

Las muestras obtenidas de la toma del exudado vaginal, anal y/o de la tela manchada, se suspenden en un mililitro de solución salina estéril y se conservan en refrigeración entre dos y ocho grados centígrados hasta su procesamiento, que debe ser inmediato.

REACTIVOS

1. Reactivo concentrado de fosfatasa ácida (2.6 milimoles de monofosfato timolftaleina sódica, con buffer y estabilizador).
2. Diluyente de fosfatasa ácida (50 milimoles de ácido acético) .

3. **Desarrollador de color (100 milimoles de hidróxido de sodio, más 100 milimoles de carbonato de sodio).**
4. **Calibrador de fosfatasa ácida (0.3 milimoles de timolftaleina con estabilizador igual a 10 unidades por litro de actividad enzimática).**
5. **Preservativo específico para fosfatasa ácida (5.0 milimoles de buffer de acetato pH= 5).**

En virtud de que se desarrolla este procedimiento con la técnica propuesta para fosfatasa ácida en suero por "Eagle Diagnostics", los reactivos que quedaron descritos se adquieren ya preparados para su uso por los Laboratorios Eagle.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar 0.5 ml del reactivo concentrado de fosfatasa ácida dentro de tubos rotulados: blanco, calibrador, control y muestra.
2. Añadir 0.5 ml de fosfatasa ácida diluida a cada tubo y mezclar bien.
3. Incubar los tubos a 37 grados centígrados aproximadamente 5 minutos.
4. Adicionar 0.1 ml de: blanco, calibrador, control y muestra a sus respectivos tubos simultáneamente o bien a intervalos controlados con cronómetro de un minuto (la incubación en el siguiente paso debe ser de exactamente 30 minutos para todos y cada uno de los tubos); mezclar suavemente. Usar agua desionizada para el blanco.
5. Incubar exactamente durante 30 minutos A 37° C.
6. Siguiendo la misma secuencia del paso 4, añadir 1.0 ml del desarrollador de color y mezclar bien.
7. Ajustar el instrumento al cero de absorbancia y longitud de onda de 590 nm usando para ello el tubo asignado como blanco.
8. Leer los valores de absorbancia para el calibrador, control y muestra o muestras problema.
9. Interpolar con la curva de calibración.

CURVA DE CALIBRACIÓN

Se efectúa con el calibrador de fosfatasa ácida, del equipo de reactivos, que contiene 300 micromoles de timolftaleína por litro y que se traduce en 10 unidades por litro de fosfatasa ácida al incubar durante 30 minutos a 37° C.

La linealidad del instrumento en estas condiciones se extiende hasta 100 unidades por litro; si la lectura excede la linealidad de la curva, efectuar diluciones de la muestra para que se cumpla la Ley de Beer y de Lambert.

Si no se tiene la curva utilizar la siguiente ecuación:

$$U/L = (\text{Abs. Muestra P} / \text{Abs. Calibrador}) \times \text{Conc. Cal.}$$

en donde:

U/L = Concentración en Unidades por Litro

Abs. Muestra p = Lectura en absorbancia de la muestra problema.

Abs. Calibrador = Lectura en absorbancia del calibrador

Conc. Cal. = Concentración del calibrador en unidades por litro³⁷.

5. 4. 3. PRUEBAS DE CERTEZA

El objetivo es hallar un espermatozoide completo. Su fragilidad es enorme; la observación de cabezas o colas aisladas no tiene significado diagnóstico de valor legal, porque existen elementos contaminantes, tales como fibras, hongos, esporas, glóbulos rojos, que se asemejan a unas y a otras

Existe multiplicidad de técnicas, pero la meta de todas ellas es conservar la integridad del espermatozoide³⁸.

Han sido denominadas pruebas de certeza por los autores clásicos y evidentemente tienen ese carácter, siendo la prueba reina en el diagnóstico genérico. Puesto de manifiesto un espermatozoide completo en la mancha esta queda identificada en cuanto a su naturaleza.

Se han propuesto muchas variantes para esta prueba, aunque las diferencias entre las distintas técnicas recaen tan solo en el procedimiento de extracción o aislamiento del espermatozoide:

1. Maceración simple, seguida de expresión, centrifugación o raspado con un escalpelo del tejido macerado y depósito de los productos así obtenidos en un portaobjetos.
2. Destrucción del soporte con ácido sulfúrico al 80% que destruye el tejido y no los espermios.
3. Tinción de los espermatozoides sin separación del tejido; la mancha macerada se disocia con dos agujas finas y los hilos se unen con los colorantes habituales o con las técnicas de impregnación argéntica, propuestas por PELLISIER y CORDONIER y los españoles PEREZ, WILLAMIL y FUSTER.
4. En los últimos años se ha propuesto el empleo de técnicas ultrasónicas para separar los espermatozoides del soporte. Según MARCINKOWSKI (1966) y GLUCKMAN (1966), estas técnicas dan un porcentaje de recuperación celular muy superior al de los métodos convencionales.
5. Otra técnica que da buenos resultados es la aplicada en citología de filtración sobre millipore y tinción⁴.

El examen microscópico hay que realizarlo en inmersión. Modernamente se han propuesto técnicas microscópicas más sensibles, como el examen en contraste de fases (MULLER), microscopia de fluorescencia (BERNARDI, DEROBERT y CAROF) o la microscopia electrónica (BERHEIM). Esta última podría identificar un espermio valorando sólo la cabeza.

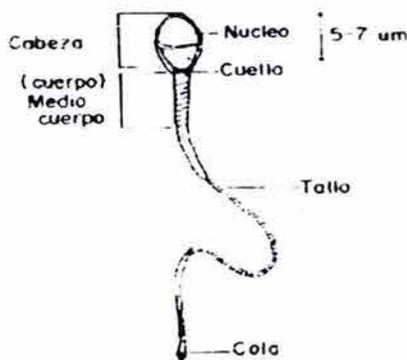
Recientemente el Prof. CONCHEIRO de Santiago de Compostela, ha propuesto una técnica de visualización de espermios por medio del microscopio electrónico de barrido (scanning electron microscopy o SEM). Esta técnica ofrece las siguientes ventajas: la preparación de la muestra es fácil, no se manipulan en exceso los espermios, de ahí que se encuentren completos; finalmente, se consiguen grandes aumentos, lo que permite identificar la célula sólo por la

cabeza. Si se dispone de este instrumental, debe realizarse directamente el examen por este método.

El hecho de no descubrir un espermatozoide completo no debe llevar a concluir que la mancha no es de esperma. En efecto, la investigación de los espermios en una mancha de esperma puede ser negativa por varias razones:

1. La deshidratación de los espermatozoides en la mancha los hace frágiles y se rompen en cabezas y colas que no tienen valor identificador.
2. Los espermatozoides se adhieren tenazmente al tejido resultando a menudo muy difícil de eluir.
3. La difusión de los espermios en la mancha no es uniforme, y cuando empleamos técnicas de tinción directa del tejido manchado, se corre el riesgo de investigar una parte donde no existan espermatozoides.
4. El líquido espermático puede no contener espermatozoides, es decir, puede proceder de un sujeto azoospermico. La azoospermia se da en un 2 % de la población, pero en la senectud es bastante frecuente⁴.

La finalidad de la coloración es crear un contraste de absorción en un sustrato que apenas ofrece una diferenciación captable óptimamente. Gracias a ella se pueden apreciar las partes elementales de la célula como son: el núcleo, citoplasma y colas.



Elaboró el dibujo el señor Regino Maldonado, experto en dibujo forense.

El aspecto de una preparación puede variar, dependiendo de la tinción empleada y el color por si mismo no tiene ningún significado especial.

Los colorantes mas utilizados en microscopia óptica pueden agruparse en ácidos o básicos; los básicos tiñen la cromatina del núcleo (hematoxilina, azul de metileno, azul de toluidina, azocarmín); los ácidos colorean la mayor parte de las estructuras aunque con intensidad variable (eosina amarillenta, azul de anilina, fucsina ácida)⁴².

En la actualidad la morfología de los espermatozoides se determina por técnicas físicas y químicas, las físicas se realizan por medio de microscopia electrónica de barrido y las químicas se realizan por medio de tinciones especiales, como las recomendadas por la OMS y estas son las siguientes:

1. Técnica de tinción de Papanicolaou.
2. Tinción de Bryan – Leishman.
3. Tinción para peroxidasa con azul de ortotoluidina.
4. Tinción de Giemsa para espermatozoides.
5. Técnicas de tinción supravital. (Tinción con Eosina Y sola y Tinción de Eosina Y con Nigrosina “modificación de la técnica de Blom”)⁴³.

Las tres primeras técnicas de tinción son laboriosas y requieren de la preparación de varios reactivos y de tiempo, para que se lleven a cabo.

Las técnicas de tinción supravital recomendadas por la OMS que son las más sencillas de realizar y solo se requiere de dos reactivos para llevarlas a cabo, por lo que en muchos lugares son las de elección para usar en los laboratorios de genética forense en el cual se realiza la observación al microscopio del frotis obtenido de muestras biológicas provenientes de delitos sexuales, para verificar la presencia y cantidad de los espermatozoides⁴².

Algunos reportes señalan identificación hasta 10 días después. En casos de violación y homicidio, el intervalo puede ser de meses, dependiendo de la preservación del cuerpo. Si la victima tuvo relaciones sexuales algunas horas antes del estupro, la motilidad espermática puede ser importante

Con un aspirador de bulbo de goma o con jeringa, se aspira líquido vaginal y se coloca en un portaobjetos que tiene una gota de salina o temperatura del laboratorio y se examina con microscopio. Una alta motilidad indica contacto sexual reciente. Se ha encontrado que los espermatozoos permanecen móviles 72

horas después del contacto sexual, dependiendo de la fase del ciclo menstrual, por tanto, hay que interpretar los hallazgos teniendo que considerar otros factores²⁷.

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. En el capítulo II en el apartado titulado Espermatozoides se describen estas células de la reproducción; a continuación se describen técnicas de tinción para su mejor visualización al microscopio.

Técnica de tinción de Giemsa para espermatozoides.

- Fijar los frotis secados al aire, en metanol durante 5 minutos por lo menos.
- Dejar a temperatura ambiente para que sequen.
- Teñir en solución de colorante de Giemsa durante 30 minutos.
- Enjuague con tampón de fosfato pH 6.9.
- Dejar secar a temperatura ambiente y observar a microscopio a 40X

Técnica de Eosina sola.

- Hacer un frotis de células espermáticas (a partir de hisopos de exudados vaginales, de semen, etc) y fijarlo a 56°C.
- Cubrir el frotis con el colorante Eosina Y al 0.5% y dejar por 5 minutos.
- Escurrir el colorante y enjuagar.
- Dejar secar y observar a microscopio a 40X.

Técnica de Eosina – Nigrosina (modificación de la técnica de Blom).

- Colocar en un portaobjetos una gota de semen o de la muestra obtenida de hisopos con muestras positivas de líquido seminal procedentes de delitos sexuales, y añadir dos gotas de Eosina Y al 1%, a los 30 segundos añadir tres gotas de Nigrosina al 10% (p/v) y mezclar.
- Hacer un extendido y secar al aire.
- Observar a microscopio a 40X⁴³.

Debido a que en los frotis, que se preparan existen células epiteliales de cavidad vaginal y espermatozoides, además de fibras y restos del soporte de la muestra, es muy importante que al visualizarlos al microscopio logren diferenciarse ambas células ya que en ocasiones por el manejo de las muestras solo se logran observar las cabezas de los espermatozoides y estas pueden llegar a confundirse o "escondarse" por eso se requiere de una técnica de tinción que permita la diferenciación entre ellas.

La QFB Martha Franco de Ambris³⁷ menciona las siguientes, utilizadas en instancias de la Procuraduría General de Justicia :

a) Técnica de Gram

Por este procedimiento, la cabeza se tiñe de color rosa y el cuerpo medio y el tallo se observan de color azul.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Colorante de crystal violeta

Solución A

Cristal violeta2 gr

Alcohol etílico absoluto..... 20 ml

Solución B

Oxalato de amonio 0.8 gr

Agua destilada 80 ml

Mezclar las soluciones A y B. Envasar en frasco gotero color ámbar.

2. Solución iodo iodurada (Lugol)

Iodo metálico 1 gr

Yoduro de Potasio 2 gr

Agua destilada 300 ml

Diluir 1:15 en agua destilada antes de usarla.

2. Decolorante

Alcohol etílico absoluto (95%)

4. Colorante de safranina

Safranina (2.5 % en alcohol etílico) ... 10 ml

Agua destilada 100 ml

PROCEDIMIENTO

El frotis o una gota de suspensión problema, se secan ligeramente al calor del mechero o bien se fijan con metanol.

- a) Añadir el reactivo de cristal violeta hasta cubrir la muestra y dejarlo actuar durante 1 minuto;
- b) Lavar con agua destilada.
- c) Cubrir nuevamente el portaobjetos con la solución 2 durante 1 minuto; tirar el exceso de lugol y decolorar con agitación utilizando el reactivo número 3 durante 30 segundos.
- d) Secar con papel filtro y cubrir la preparación con el reactivo asignado con el número 4; dejarlo actuar de 10 a 30 segundos.
- e) Lavar con agua destilada y observar al microscopio con aceite de inmersión y el objetivo correspondiente.

INTERPRETACIÓN

Las células espermáticas aparecerán teñidas: la cabeza de color rosa y el resto del cuerpo y cola azules.

b) Técnica con azul de metileno

Colorante de azul de metileno:

Azul de metileno	1 gr
Alcohol etílico absoluto (95%)	30 ml
Agua destilada	100 ml
Acético glacial	5 ml

Disolver el azul de metileno en el etanol, añadir el ácido acético y el agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Fijar el frotis que contiene la muestra problema por medio de calor como en el caso anterior.

- a.) Cubrir la preparación con el colorante de azul de metileno.
- b) Dejarlo actuar durante un minuto.
- c) Retirar el colorante y lavar con agua.
- d) Observar al microscopio con aceite de inmersión, e igual objetivo

INTERPRETACIÓN

Los espermatozoides se observarán coloreados tanto la cabeza como cuerpo y cola de color azul.

c) Técnica de Christmas Tree

Colorante Rojo rápido nuclear :

Rojo rápido nuclear	50 mg
Sulfato de Aluminio	2.5 gr
Agua destilada	100 ml

- Calentar a ebullición, los 100 ml de agua destilada y disolver en ellos el sulfato de aluminio; adicionar el colorante rojo rápido nuclear; mezclar con agitador mecánico, hasta disolución completa.
- Enfriar y filtrar en papel Wathman No.1
- Almacenar en frasco gotero ámbar a una temperatura entre 2 y 8°C.

Colorante de Índigo Carmín

Ácido pícrico	1.3 gr
Índigo Carmín	0.23 gr
Agua destilada	100 ml

- Disolver el ácido pícrico en los 100 ml de agua.
- Añadir los 0.3 gramos de índigo carmín.
- Mezclar perfectamente con agitador mecánico.
- Guardar en frasco gotero ámbar.

PROCEDIMIENTO

- a) Una vez fijado el frotis, añadir dos gotas de rojo rápido nuclear y dejarlo reposar en cámara húmeda durante 15 minutos (puede utilizarse una caja de Petri, colocando en la base y el interior de la tapa, un papel filtro húmedo).
- b) Lavar con agua desionizada, durante 5 segundos, añadir una gota de colorante número 2 y dejarlo reposar durante 15 a 30 segundos.
- c) Lavar con etanol absoluto para decolorar, secar por 5 minutos.

INTERPRETACIÓN

Al observar al microscopio, el núcleo del espermatozoide, aparecer en color rojo. El acrosoma y la cola, de color verde.

d) Técnica de Papanicolaou

El método de coloración de Papanicolaou se puede hacer progresivo o regresivo. En el primero el núcleo se tiñe con hematoxilina a la intensidad deseada y después se vira a azul con hidróxido de amonio, carbonato de litio o agua de la llave. En el método regresivo el núcleo se sobrecolorea con hematoxilina y el exceso de colorante es eliminado con una solución diluida de ácido clorhídrico, que a su vez es eliminado con agua de la llave. Del tiempo de acción del ácido clorhídrico depende el aspecto final de patrón nuclear.

Preparación de reactivos

a) Hematoxilina de Harris

Hematoxilina 1.0 g

Alcohol absoluto	10.0 ml
Sulfato de aluminio y potasio	20.0 g
Agua destilada	200.0 ml
Oxido rojo de mercurio	0.5 g

Disolver en un matraz la hematoxilina en el alcohol. En otro matraz con el agua caliente agregar el sulfato de aluminio y potasio (alumbre). Mezclar las dos soluciones, llevar a ebullición. Agregar el óxido rojo de mercurio lentamente y agitar hasta que la mezcla tome un color rojo púrpura oscuro y ya no aparezca óxido en la solución, retirar del fuego, dejar reposar y filtrar. El colorante se puede utilizar en cuanto se enfría. El detalle de la coloración nuclear es mejor cuando se agregan 2-4 ml de ácido acético glacial por 100 ml de la solución. Se emplea en el método regresivo, su duración es de años.

La hematoxilina no es un colorante, debe ser transformada en hemateína para que actúe como colorante nuclear. Para lograrlo, en la preparación de la solución de hematoxilina se utiliza: un oxidante, un mordente, un solvente y un ácido.

b) Colorante Orange G

Solución de Anaranjado G al 1%	1000.0 ml en alcohol 96°
Acido fosfotúngstico	0.015 g

c) Colorante EA 36

Solución de Verde Luz marillento al 0.1% en alcohol de 96°	45.0 ml
Solución de Café de Bismarck al 0.5% en alcohol de 90°	10.0 ml
Solución de Eosina Amarillenta al 0.5% en alcohol de 96°	45.0 ml
Acido Fosfotúngstico	0.2 g
Solución acuosa saturada de carbonato de litio	1 gota

Mezclar todos los colorantes y reactivos.

d) Para preparar alcohol de 50° y 70°, se hacen diluciones a partir del alcohol de 96°.

Para hacer la coloración por el método de Papanicolaou todos los reactivos, colorantes y el agua se colocan en cajas de vidrio con tapa, diseñadas para hacer coloraciones histológicas. Los portaobjetos en los que se han hecho los frotis de las muestras, se colocan en canastillas de vidrio o de metal y en éstas se van pasando a través de las cajas antes mencionadas.

PROCEDIMIENTO	REACTIVOS	TIEMPO EN MINUTOS
Fijación	Alcohol de 96° Spray	15
Eliminación del carbowax del spray	Alcohol de 96°	1
Hidratación	Alcohol de 70°	1
	Alcohol de 50°	1
	Agua destilada	3
Coloración nuclear	Hematoxilina	1
Eliminación del exceso de colorante	Agua destilada	1
Virar la hematoxilina	Agua de la llave	6
Lavar	Agua destilada	3
Deshidratar	Alcohol de 50°	1
	Alcohol de 70°	1
	Alcohol de 96°	1
Coloración citoplasmica	OG 6	6
Eliminación del exceso de decolorante	Alcohol de 96°	1
Coloración citoplásmica y nucleolar	EA	6
Eliminación del exceso de colorante	Alcohol de 96°	1
Deshidratación	Alcohol absoluto	5
Transparentación	Alcohol absoluto-xileno	15
	Xileno	20
Montaje	Resina sintetica	

Resultados: Núcleo: azul; citoplasma: azul, verde, rosa y naranja. Los frotis coloreados con el método de Papanicolaou se observan al microscopio óptico primero con el objetivo de 10 x para evaluar la calidad del material y la coloración, así como para determinar los caracteres generales de dicho material, posteriormente, con el objetivo de 40X para precisar y evaluar los datos morfológicos que permitan hacer un diagnóstico. En ocasiones, es necesario hacer algunas observaciones con el objetivo de inmersión. Los espermatozoides se tiñen del colorante nuclear según la técnica⁴⁹.

5. 5. DIAGNOSTICO INDIVIDUAL DE LA MANCHA DE ESPERMA

El diagnóstico de especie es en base a sueros precipitantes in vitro, métodos anafilácticos en cobayos sensibilizados y también in vitro la fijación del complemento, El diagnóstico de individuo posible o descartado es en base a los aglutinógenos O, A, B y AB y los métodos de absorción. Su factor de error principal es la presencia de sangre de la víctima, su saliva u orina, en especial por agregar aglutinógenos o por poseer igual grupo que el acusado⁶.

El esperma contiene aglutininas y aglutinógenos que se corresponden exactamente con el grupo sanguíneo del individuo; estas propiedades grupo específicas tienen el mismo valor médico-legal que el relativo a manchas de sangre³⁸.

5. 5. 1. DETERMINACIÓN DEL GRUPO DEL SISTEMA ABO EN SEMEN

FUNDAMENTO

Para esta determinación es necesario tomar muestras de sangre y saliva de la víctima. La muestra de saliva tiene por objetivo aclarar si la víctima es de tipo secretor. De este modo, toda mancha que muestre grupos diferentes corresponderá al agresor o agresores³.

A continuación se describen las bases para la aplicación de las pruebas de serología forense.

La sangre de todas las personas concuerda con uno de los cuatro grupos primarios O, A, B, o AB como resultado de que sus eritrocitos contienen alguno, ambos o ninguno de los aglutinógenos. Lattes expuso "el factor de pertenencia a un grupo sanguíneo es un carácter fijado en cada ser humano y que no puede alterarse por el tiempo ni por la enfermedad en proceso" ¹³. La sangre de la misma manera que las huellas digitales, es un carácter primario inalterable.

En el transcurso de los años se descubrieron otros complejos grupales, cuya frecuencia dependía de nuevo de los factores geográficos, raciales y étnicos. Por ejemplo el factor Rhesus (Rh) se encuentra en casi el 85% de la población indígena inglesa, pero prácticamente en 100% de las personas de raza asiática.

Se tienen que preparar anticuerpos de todos los grupos ABO, ya que estos no se presentan de manera natural. El reconocimiento de los componentes de una proteína específica de la sangre se basa en la separación electroforética. Otro descubrimiento útil fue que cerca del 80% de la gente secreta sustancias grupales solubles al agua idénticas a sus grupos sanguíneos, en su sudor, saliva, semen y otros líquidos corporales. Estos "secretores" se pueden identificar de las manchas seminales e incluso de la saliva de mordidas, si es que las técnicas son lo bastante sensitivas para detectar las sustancias grupales¹³.

Las sustancias del grupo ABO solubles en agua, están presentes en el líquido seminal y en la saliva de individuos secretores de tales sustancias (aproximadamente el 85% de la población en México) y pueden determinarse por el método de absorción-inhibición, ya que se encuentran en grandes concentraciones en esos individuos³⁷.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Suero anti-A. Diluir 3.5 ml de antisuero con 450 ml de buffer salino, se deben utilizar sueros selectos.
2. Suero anti-B. Diluir 1.0 ml del suero con 450 ml. de buffer salino.
3. Anti-H lectina. Se utiliza como viene el producto comercial.
4. Buffer salino:
 - a) Na_2HPO_4 anhidro 1/15 molar (4.47 gramos por litro).
 - b) KH_2PO_4 anhidro 1 /15 molar (9.09 gramos por litro).

5. Solución final:

72 ml de la solución a), más 28 ml de la solución b), más 8.5 gramos de NaCl disueltos en 1,000 ml de agua destilada. En esta forma se obtendrá un pH de 7.2.

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS TESTIGO

Hacer suspensiones al 2% de eritrocitos de grupos conocidos O, A₁ y B, en buffer salino.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Fragmentos de tela de 1 X 1 mm, se impregnan con la muestra problema y con los testigos. Cada uno de los fragmentos se coloca en los tubos respectivos.

	Problema	Control	Testigos
Anti- A			
Anti B			
Anti- H			

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

1. Colocar tres gotas de anti-A a la hilera de anti-A; tres gotas de anti-B en su hilera y tres gotas de anti-H en la hilera de anti-H.
2. Agitar vigorosamente.

3. Dejar que se efectúe la absorción durante toda la noche en refrigeración a 4°C.
4. Centrifugar.
5. Remover el sobrenadante y colocarlo en una lámina hemoclasificadora.
6. Agregar una gota de suspensión de eritrocitos al 2% de A₁ en cada uno de los tubos de la hilera de anti-A; una gota de células B en la hilera de anti-B y del grupo O en la hilera de anti-H.
7. Agitar mecánicamente durante 10 a 12 minutos y esperar 9 minutos más.
8. Leer los resultados al microscopio.

INTERPRETACION

1. Si se observa aglutinación con anti-A y con anti-B, pero no con anti-H, el grupo será O.
2. Si hay aglutinación en los tubos con anti-B y con anti-H, pero no en el de anti-A, el grupo es A.
3. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B.
4. Si no existe aglutinación con anti-A ni con anti-B, pero sí con anti-H, el grupo es AB³⁷.

Es necesario aclarar que la determinación de esperma posee límites que no sólo dependen de la cantidad y calidad del material obtenido, sino también de la experiencia e idoneidad científica del que la realiza³⁸.

6. ESTUDIO DEL MATERIAL GENETICO (DNA) EN MUESTRAS PROVENIENTES DE DELITOS SEXUALES

6. 1. INTRODUCCION

Debido al principio de la individualidad genética, que está definida por un conjunto de marcadores genéticos que el individuo hereda de sus padres, podemos obtener lo que justificadamente se ha llamado "huella digital del DNA".

El material genético está contenido en los 46 cromosomas del núcleo celular y en el DNA mitocondrial. Este solo es heredado al hijo por la madre, ya que durante la fecundación, no pasa al óvulo, en virtud de que a él sólo entra la cabeza del espermatozoide y el DNA mitocondrial se encuentra en el cuello de la célula espermática.

Todas las células que forman un ser humano, proceden de una sola célula, el cigoto, la cual se origina en la fertilización al unirse las células sexuales: el óvulo y el espermatozoide, que contienen cada uno de ellos, en su núcleo, 23 pares de cromosomas homólogos; 22 de ellos son autónomas y un par de cromosomas: XX en la mujer y XY en el hombre. Los cromosomas son los portadores de los genes, constituyéndose en estructuras celulares de gran importancia en la transmisión del material genético durante la reproducción. Se da el nombre de locus (lugar), a la ubicación exacta de un gen, en un cromosoma.

Un cromosoma está constituido por una gran molécula de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), unidad de proteínas y contiene alrededor de 100,000 genes en promedio.

El DNA está formado por dos cadenas en forma de hélice y contienen 4 diferentes nucleótidos: la adenina, A; la citosina, C; la guanina, G y la timina, T; las que se repiten una y otra vez, en secuencias variables a lo largo de las cadenas. Estas dos cadenas de nucleótidos que forman la hélice, están unidas entre sí, por puentes de hidrógeno.

Los genes, son fragmentos de DNA, de los cromosomas que codifican a las proteínas, las cuales intervienen integralmente en las funciones y estructuras, del conjunto de las células del cuerpo humano.

El DNA humano contiene aproximadamente entre 50 y 100 mil genes diferentes; los genes están localizados en locus particulares de los cromosomas y muchos de ellos pueden existir en formas variables llamadas alelos, que difieren en la secuencia de nucleótidos del DNA: para el gen X, puede existir en la población, variantes en sus alelos: X1, X2, X3, X4 y cada individuo puede tener solo dos de esos alelos; uno en cada cromosoma, de un par homólogo. Si un individuo, posee dos copias idénticas, de un alelo en particular, es homocigoto, en ese locus, y si los tiene diferentes, es heterocigoto.

La identificación, por técnica que nos ocupa, se basa en la caracterización de las regiones variables o polimórficas del material genético de los individuos.

Un locus es polimórfico, si existen muchas variedades de ese gen, en la población estudiada. El 1% de las células codifica, para proteínas, o constituye genes. El 30% del genoma humano que no codifica, es porque son secuencias repetidas de DNA, llamadas minisatélites, que constan de repeticiones en tandem (conjunto de fragmentos iguales), de una secuencia de DNA, de tamaño variable y son muy polimórficas.

Los marcadores genéticos que pueden ser útiles en la huella digital de DNA, deben ser muy polimórficos; tener una frecuencia alélica y genotípica muy baja y un gran poder de discriminación o capacidad de distinguir a dos individuos.

La herencia de los alelos de los diferentes sistemas, se da de acuerdo con las Leyes de Mendel, de la genética clásica; por lo tanto los patrones o haplotipos, pueden ser establecidos estadísticamente, de acuerdo con la frecuencia alélica y genotípica de una población dada. De ahí la importancia de contar con un eficiente banco de datos que abarque a toda la población, incluyendo las comunidades que por razones raciales o religiosas, se aíslan³⁷.

En la última década, los avances tecnológicos y científicos han originado un progreso importantísimo en el campo de la identificación forense. Actualmente los análisis del polimorfismo genético permiten resolver pericias que hace unos años era impensable concluir con tanta certeza. Hoy día es posible la individualización del autor de una violación, la identificación de restos cadavéricos o determinar si un pelo procede de un hombre o de una mujer, Como puede verse se trata de una auténtica revolución en el campo forense, quizás el paso más importante a lo largo de toda su historia.

Efectivamente, los avances científicos han sido considerables en el ámbito de la Biología Molecular, pero no se debe olvidar que si importante es la labor que se lleva a cabo en un laboratorio forense con el objetivo de obtener resultados positivos en el análisis genético de la evidencia que se remite, tanto

o más importante es una correcta recogida y remisión de esa muestra al laboratorio. No hay que olvidar que el trabajo del laboratorio se inicia sobre la evidencia que se recibe, es decir, si en el momento de tomar la muestra en el lugar de los hechos ésta no es recogida y/o enviada de forma correcta puede que el análisis sobre dicha muestra no sea factible.

Para que cualquier evidencia biológica pueda ser analizada y la pericia se pueda asumir con total fiabilidad se deben cumplir algunos aspectos fundamentales. Por una parte, el personal encargado de realizar la recogida de las muestras debe ser competente y calificado para llevar a cabo dicha labor; todo el proceso de recogida y remisión de muestras debe realizarse de forma perfectamente coordinada y planificada.

Otro punto importante es la necesidad de la existencia de todos los medios y materiales adecuados para poder recoger y remitir correctamente las muestras al laboratorio, es decir, pinzas, guantes, máscaras, bolsas, neveras refrigeradas, etc. Por último, es muy importante que se cumpla de forma estricta la cadena de custodia a que se debe someter cualquier muestra.

Según la opinión profesional, cumpliendo los puntos anteriormente expuestos se puede garantizar un análisis fiable de las muestras biológicas que sean remitidas.

6. 2. CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA

Cuando una evidencia es recogida del lugar de los hechos, ésta debe ser perfectamente identificada y aislada para evitar la posible contaminación biológica sobre la muestra.

Pero ¿qué se entiende por contaminación biológica? Está puede definirse como un aporte "extra" de material genético al propio de la evidencia. Este hecho origina, por tanto, una mezcla de material genético que puede crear cierta confusión en el análisis de las muestras y posterior interpretación de los resultados.

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) aplicada a fines criminalísticos es una herramienta importantísima para la tecnología del DNA. Con el uso de esta técnica pueden obtenerse millones de copias de una determinada zona del genoma y esto es posible hacerlo a partir de una sola célula. Esta herramienta es sumamente útil para obtener resultados positivos a partir de muestras con muy escasa cantidad de material genético (p. ej., un

solo pelo) y que son tan frecuentes de encontrar en el área forense. Esta potencia que aporta la técnica de PCR puede volverse paradójicamente contra la propia investigación. La PCR de la misma manera que presenta sensibilidad suficiente como para amplificar una célula perteneciente a alguna evidencia dejada en el lugar de los hechos también y precisamente debido a esa alta sensibilidad puede amplificar células dejadas involuntariamente sobre esa evidencia (pelo, saliva, células epidérmicas).

La contaminación de una muestra se puede ocasionar antes de la recogida de la evidencia durante el proceso de recogida y/o remisión, o bien una vez que la muestra se encuentra en el propio laboratorio de análisis.

En ocasiones la muestra en su origen ya presenta una mezcla de material genético por ejemplo en el caso de agresiones donde más de una persona intervienen. Este tipo de contaminación es inevitable y a menudo es de gran interés en la investigación.

Otro tipo de contaminación realmente preocupante, aunque evitable, es la que se produce por descuido, negligencia o desconocimiento a la hora de recoger y/o remitir las muestras al laboratorio. Cuando se analizan muestras que presentan este tipo de contaminación los resultados que se obtienen son realmente confusos y sumamente desconcertantes originando conclusiones que pueden llegar a ser incorrectos.

Por último, otra posibilidad de contaminación sobre la muestra puede darse en el propio laboratorio, bien por material genético existente de previas extracciones o bien a partir de material biológico del personal que allí trabaja.

La introducción del análisis de secuenciación del DNA mitocondrial (DNAmt) con fines de identificación forense exige más, si cabe, extremar las precauciones que eviten problemas de contaminación.

Una de las principales ventajas de utilizar esta técnica es el elevado número de moléculas de DNAmt que se puede encontrar por célula (hasta 10,000 copias) lo que permite un índice de éxito mayor durante el proceso de amplificación por PCR. Esta ventaja en ocasiones puede convertirse en un inconveniente ya que la alta sensibilidad ampliaría pequeñas contaminaciones que ocasionarían lecturas de secuenciación imposibles.

6. 3. DEGRADACIÓN

Otro posible e importante problema es la degradación de las muestras. Cuando se habla de DNA degradado se hace referencia a un material genético que por acción, generalmente bacteriana, ha sido fragmentado de forma inespecífica por la actuación de nucleasas.

Una de las importantes ventajas que aporta la PCR Es la capacidad para poder amplificar material genético que se encuentra parcialmente degradado; no obstante cuando este nivel de degradación es muy elevado la amplificación de marcadores genéticos clásicos por la técnica de PCR es realmente complicado.

Al igual que se comentó anteriormente existe un tipo de degradación que no se puede evitar. Cuando se recogen evidencias que han estado expuestas durante cierto período de tiempo a condiciones naturales de humedad ambiental, fenómenos meteorológicos, presencia de insectos, bacterias y hongos, es muy probable que esa muestra presente un cierto grado de degradación «natural», siempre inevitable. En otras ocasiones, cuando la recogida y sobre todo el envío de esas evidencias no se ha realizado de la manera adecuada pueden aparecer problemas de degradación, evitables con un correcto procedimiento. Es usual, aunque por suerte cada vez menos, el envío de muestras húmedas en bolsas cerradas, lo cual crea un ambiente muy propicio para la proliferación bacteriana, con la subsiguiente degradación del material genético. Este problema queda subsanado si el envío de la muestra se realiza cuando ésta se ha dejado secar absolutamente a temperatura ambiente. En otras ocasiones, el envío se realiza sin refrigerar las muestras o dejando pasar periodos de tiempo demasiado largos entre la recogida y la llegada al laboratorio de la muestra, hecho que también favorece la degradación de la evidencia.

Existe otra serie de efectos que puede dañar el material genético. Así por ejemplo, la exposición de las muestras a los rayos ultravioleta durante un período de tiempo más o menos largo provoca daños sobre la estructura del DNA. Otro factor que puede dificultar enormemente el análisis es el efecto que ciertos conservantes pueden provocar sobre la cadena del DNA; es el caso del formaldehído, que siendo un importante conservante utilizado frecuentemente en la práctica histopatológica, es por otro lado un nefasto fijador de ácidos nucleicos. Esta mala fijación se traduce en limitadas extracciones de DNA, siendo mayor esta pérdida cuanto mayor sea el tiempo de exposición al conservante.

Por todo lo expuesto, conviene dar una serie de normas generales y particulares para las diferentes muestras que conviene cumplir si se pretende llevar a cabo un análisis de polimorfismo genético sobre muestras de origen biológico.

NORMAS GENERALES SOBRE LA RECOGIDA DE EVIDENCIAS BIOLÓGICAS

Se describen en este apartado una serie de puntos que constituyen los requisitos básicos para poder asumir un análisis con ciertas garantías de calidad.

1. Protección de la zona, en el lugar de hechos, impidiendo el paso a personas no autorizadas, ni calificadas en la recogida de indicios.
2. utilización de material estéril, si es posible de un solo uso, cuando no es posible desechar el material (pinzas) se debe limpiar minuciosamente antes de recoger otra muestra. El uso de guantes durante todo el proceso, cambiándolos entre muestra y muestra. Se recomienda el uso de mascarilla y gorros de quirófano.
3. Las muestras deben ser guardadas de forma individual en envoltorios que permitan su transpiración, absolutamente estériles y sin previa utilización con ningún otro fin. Introducir más de una muestra en el mismo recipiente puede ocasionar problemas de contaminación.
4. Cada una de las muestras que se envía al laboratorio debe estar perfectamente etiquetada e identificada, debiendo constar el tipo de muestra, el día de recogida, el número de referencia de la muestra y el juzgado que remite la evidencia.

5. El envío de las muestras se debe realizar manteniendo su refrigeración y utilizando el medio de transporte que resulte más rápido.
6. Sobre las muestras que requieran un análisis de DNA no se debe añadir nunca ningún tipo de conservante que pudiera perjudicar los procesos de extracción y/o amplificación del material genético.

Hasta aquí se han dado normas generales que conviene cumplir siempre en la recogida de muestras, pero existen una serie de consideraciones particulares según la naturaleza de la propia muestra que se exponen a continuación (normas para la preparación y remisión de muestras objeto de análisis por el Instituto Nacional de Toxicología. BOE, n.º108, de 23 de diciembre de 1996). Existe un amplio espectro de muestras sobre las que se puede realizar un análisis genético.

6. 4. MUESTRAS PROCEDENTES DE AGRESIONES SEXUALES

Cuando se denuncia una agresión sexual, lo recomendable es realizar una toma vaginal, anal o bucal mediante hisopos estériles y secos, que se guardarán en sus correspondientes fundas sin la adición de ningún líquido conservante. Por otra parte, también es aconsejable la realización de un lavado vaginal, anal o bucal con aproximadamente 10 ml de suero fisiológico estéril.

En todos los casos se identificarán perfectamente las muestras y se remitirán refrigeradas por el medio más rápido. Este punto es especialmente importante debido al alto contenido en microorganismos que se encuentran en las cavidades citadas de donde proceden las muestras cuya remisión en condiciones de alta temperatura favorecería la proliferación bacteriana con la consiguiente degradación del material genético.

En lo referente a las ropas que sean remitidas tanto de la víctima como del agresor, deben enviarse en envoltorios individuales y estériles que deben permitir la perfecta transpiración de las prendas. En este punto es importante señalar que si las prendas están húmedas o mojadas se deben dejar secar a temperatura ambiente y, una vez secas, actuar como se ha descrito anteriormente.

MUESTRAS DE SEMEN

El estudio de restos de semen como evidencia en casos de agresión sexual es, junto con el de vestigios sanguíneos, el tipo de análisis más solicitado en el laboratorio de biología forense.

Antes de la aplicación de las técnicas de individualización por DNA, las pruebas físicas que demostraban la comisión de un delito contra la libertad sexual se basaban en el hallazgo de espermatozoides y de actividad fosfatasa ácida prostática. Una reducida batería de proteínas polimórficas y marcadores de grupo sanguíneo (ABO, PGM. Gc. etc.) contribuía con escasa información a resolver el problema de la identidad de la evidencia hallada. Sus resultados eran a menudo de difícil interpretación por problemas inherentes a la muestra, tales como la frecuente contaminación del semen con fluidos vaginales (que contribuyen con sus propias enzimas y grupo sanguíneo al resultado), o la presencia en el semen de enzimas proteolíticas que reducen la cantidad de proteínas recuperadas, e incluso la actividad bacteriana que puede conducir a resultados erróneos, sobre todo en el caso del grupo ABO.

La aplicación de técnicas de estudio de polimorfismos DNA ha superado muchos de los problemas que se planteaban con el uso de marcadores convencionales, pero también se enfrenta a sus propias limitaciones.

Una de sus mayores ventajas es que ofrece la posibilidad de resolver las mezclas de semen con otros fluidos biológicos procedentes de la víctima (fluidos vaginales, sangre o saliva), gracias a un método de extracción conocido como "lisis diferencial", que se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergente y proteinasa K en ausencia de un agente reductor. En un primer paso, la muestra se incuba en una disolución con SDS (Dodecil sulfato sódico 20%) y proteinasa K y produce la rotura de las células epiteliales, pero no de los espermatozoides, que pueden recuperarse por centrifugación. En el sobrenadante de esta primera digestión queda el DNA procedente de la víctima. El precipitado, que contiene los espermatozoides íntegros, tras varios lavados se incuba de nuevo en una solución con SDS y proteinasa K, añadiendo esta vez el agente reductor DTT (Ditiotreitol 1 M). Tras la digestión, esta segunda fracción contiene el DNA de los espermatozoides.

De esta forma se obtiene información procedente de la víctima y del agresor por separado, y a partir de este punto cada fracción seguirá un protocolo rutinario de aislamiento de DNA, ya sea con fenol-cloroformo, o Chelex. Si el método elegido es el Chelex, es posible que sean necesarios pasos adicionales de purificación para aumentar el rendimiento en la amplificación.

Aunque la extracción diferencial resuelve las mezclas de semen con otros fluidos, no es de utilidad cuando el esperma procede de un individuo azoospermico o vasectomizado. La cantidad potencial de DNA que puede recuperarse en este caso disminuye drásticamente. En 1 ml de eyaculado de un individuo espermico pueden obtenerse aproximadamente 450 ng de DNA a partir de los espermatozoides, mientras que los otros elementos formes del semen (leucocitos y células epiteliales) contribuyen con 30 ng. Esto supone que el contenido en DNA del semen de un Individuo azoospermico es solo un 6.3 % del que se obtiene en un individuo espermico.

Teóricamente es posible la identificación de estas muestras si se tiene en cuenta que la aplicación de técnicas de PCR es factible a partir de cantidades tan pequeñas de DNA como 2.5 ng, incluso si éste está degradado. Estos bajos requerimientos de calidad y cantidad han permitido realizar con éxito la tipificación de muestras tan mínimas como las contenidas en una preparación citológica, cuyo estudio puede ser necesario si es la única evidencia de casos antiguos en los que no se disponía de la tecnología actual, o en aquellos casos en los que la muestra remitida al laboratorio es el frotis sobre el que se ha estudiado la presencia de espermatozoides. Tras retirar el cubreobjetos con xilol y un par de lavados en etanol, el proceso de extracción puede llevarse a cabo directamente sobre el portaobjetos o bien puede retirarse la muestra por lavado con un hisopo y procesar éste según protocolos de rutina. Existen también técnicas avanzadas de micromanipulación que permiten, bajo observación microscópica, succionar los espermatozoides uno a uno, directamente desde el portaobjetos a través de un microcapilar con un diámetro de punta de 10 μm . Aplicando PCR pueden obtenerse resultados a partir de 15 espermatozoides.

Sin estas refinadas técnicas de micromanipulación, el límite de detección en preparaciones experimentales es de 150 espermatozoides aporximadamente. Con respecto a la posible influencia sobre el éxito en la amplificación de la técnica de tinción utilizada en el frotis, se han realizado estudios que demuestran que los reactivos usados para tinciones rutinarias de muestras de semen (tinción ginecológica, christmas tree, hematoxilina-eosina, Papanicolaou) no afectan a la posibilidad de extraer y amplificar DNA de estas preparaciones. Únicamente fracasan en la amplificación las tratadas con técnica de Baecchi (fucsina ácida y azul de metileno disueltos en HCl al 1%).

Recientemente, el estudio de evidencias en casos de agresión sexual, en particular aquellas que se presentan en cantidades trazas, se ha beneficiado mucho de la incorporación en las baterías de tipificación de microsátélites específicos del cromosoma Y. Estos Y-STR incrementan notablemente el índice de éxito en la identificación del componente masculino en mezclas de fluidos biológicos hombre/mujer en los que la lisis diferencial es inútil o en aquellas en las que sea de alto riesgo su aplicación (muestras muy degradadas o con muy pocos espermatozoides). En el caso concreto de mezclas muy desproporcionadas, se ha comprobado que incluso grandes cantidades de

DNA femenino no inhiben la amplificación de alelos ligados al cromosoma Y característica que les da ventaja sobre los sistemas autosómicos²⁴.

Para lograr lo hasta aquí anotado debe seguirse la siguiente metodología.

1. Extraer el material genético de las muestras problema (sangre, semen, saliva, tejido blando, tejido óseo, manchas o de células epiteliales) impregnadas en algún soporte. En virtud de que el DNA no se encuentra totalmente solo en el núcleo de las células, se aplica una lisis diferencial de tipo iónico, al adicionarle un detergente, con la finalidad de ir lisando pared celular y diferencial de centrifugación; esta operación llamada "lavado", se va repitiendo para seguir degradando de manera diferencial iónica y centrifugación, hasta llegar al núcleo y después ir degradando a las proteínas provenientes del núcleo, hasta obtener el DNA de alto peso molecular y pureza, para no afectar el proceso de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Para asegurarse de la pureza del DNA se efectúa un lavado con una solución de cloroformo impregnado con fenol, para eliminar algún resto de proteínas, se mezcla perfectamente en un mezclador tipo vortex y se separa la fase acuosa, de la orgánica por medio de centrifugación. Se adiciona un volumen igual al de la fase acuosa, (que es la útil pues es donde va disuelto el DNA) de etanol absoluto frío el cual precipita al DNA. El etanol lo desplaza, ya que éste es más soluble en agua que el DNA.
2. Una vez extraído el material genético, se cualifica y cuantifica a través de electrofóresis horizontal, que consiste en preparar una gelatina de un grosor de 0.6 cm y con una superficie de 14 cm, de largo por 11 cm, de ancho. Esta gelatina se prepara con agarosa grado proteínas, con una concentración que va del 0.8 al 1.0%, concentración que permite desplazar el DNA, a través de los sitios activos de la agarosa. Se deja desplazar únicamente 1.5 cm, a partir del origen, pues si se deja correr mas, no se puede cualificar si es o no de alto peso molecular, puesto que se lleva a cabo un barrido en el que no se observa una sola banda. Una banda bien definida a esa distancia, asegura un DNA, de alto peso molecular.

Para cuantificar el DNA en la muestra, se puede proceder de dos formas: una de ellas se efectúa, preparando un gel de agarosa, en donde se colocan estándares de peso molecular conocido, de 50, 100, 250 y 300 ng (nanogramos por cada 10 microlitros uL) y de acuerdo a la intensidad de la banda, se extrapolan con las bandas obtenidas de las muestras problema, determinando así la concentración del material genético.

Otra forma de cuantificar el DNA, se efectúa por espectroscopía de luz ultravioleta. Las absorbancias que lo caracterizan son de 260 y 280 obviamente en la región del ultravioleta, para determinar la pureza y la concentración del material genético.

3. Después de cuantificar, se toman en promedio de 2 a 8 nanogramos de DNA para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La PCR es un tipo de clonación, puesto que se trata de generar copias exactas de un fragmento específico, de algún oligonucleótido del genoma humano y de naturaleza polimórfica, esto es que tiene un alto índice de variabilidad y puede diferenciar a individuos muy parecidos.

LA PCR, consta de 30 ciclos en promedio y cada ciclo se obtiene a diferente temperatura. Las temperaturas dependen de los "primers" o cebadores; éstos se refieren a una secuencia de oligonucleótidos específica, que son, el o los moldes, que generan el fragmento que se quiere amplificar. La primera temperatura utilizada es de 90°C, donde la doble hélice de DNA, se separa en dos hebras de DNA; rompiéndose los enlaces de hidrógeno generando dos cadenas de DNA. Después se somete a una temperatura de 60°C momento en que los "primers" o cebadores, se pegan a cada fragmento de DNA y la última temperatura, se eleva a 70°C, en donde la enzima Taq polimerasa, comienza a colocar, de acuerdo a la secuencia de los "primers", cada base purica y piridimica, (se encuentran en la solución, como el dATP, dCTP, dTTP y dGTP), generando a partir de una doble hélice, 2 hélices de DNA; de dos se obtienen cuatro y así sucesivamente hasta completar en promedio, 30 ciclos, los que generan millones de secuencias en cuestión.

4. Al final de los ciclos programados, el producto amplificado es sometido a una temperatura final de 72°C, por un período de tiempo de 7 minutos, con la finalidad, de asegurar la unión de las cadenas de DNA formadas. Los factores que pueden afectar la amplificación son; la pureza del DNA, la concentración del mismo y la temperatura de amplificación.
5. Al final de la reacción en cadena de la Polimerasa, se elabora un gel de agarosa grado PCR al 4% dependiendo de la muestra y para verificar la presencia de la misma, deberá aplicarse al gel, la llamada "escalera de peso molecular" para determinar con precisión los productos de PCR.

Una vez hecho lo anterior se determinará el genotipo de cada muestra, lo que puede lograrse utilizando cualesquiera de los

siguientes procedimientos: uno de ellos es por medio de tiras Dot-Blot , que utiliza unas tiras de nylon en donde se encuentran fijadas covalentemente los oligonucleótidos específicos, en forma de cadena simple polimórfica; posteriormente se les adiciona el complemento, mismo que se distinguirá en color, cuando se unan, formando así la doble hélice, que se identificará en forma de un color, generando un punto, que representa un alelo, dos alelos forman un genotipo.

El otro procedimiento, consiste en efectuar una electrofóresis vertical, en gel de acrylamida. Esta técnica es más sensible que la anterior. Los genotipos son de naturaleza alfanumérica, lo que significa que los podemos leer, unos en forma de números y otros en forma de letras. Para tal propósito, pero únicamente para la técnica de reverso de Dot-Blot, el DNA amplificado, se somete a una temperatura de 95°C durante 8 a 15 minutos, con la finalidad de separar la doble hélice amplificada, inmediatamente se toma un volumen de 20 microlitros de este material, precalentado, mismo que se colocará en tiras. La unión entre el oligonucleótido y el DNA problema, se llevará a cabo formando un complejo, que se formará de acuerdo a las características astringentes, pH y temperatura, de las soluciones, durante todos los pasos que se llevan a cabo al efectuar la técnica del reverso del Dot-Blot. En este caso, los alelos obtenidos, se correlacionan con los obtenidos de las muestras tanto del lugar de los hechos, como los del presunto responsable, alelos que deberán ser idénticos, si se trata de la misma persona.

Para determinar genotipos por medio de la electrofóresis vertical, obsérvese que ésta en la parte superior presenta pozos, en los que se aplica muestra equivalente al tamaño del pozo y se aplica también un marcador de referencia, que señale los alelos presentes en la muestra. De esta manera se obtiene un patrón de bandas, que debe ser igual al de la persona que se trata de identificar, si se obtiene algún alelo diferente se puede hacer la exclusión de una manera absoluta.

Los marcadores genéticos se emplean de acuerdo a su naturaleza polimórfica, utilizando los modelos matemáticos que indican, si el valor de heterocigocidad, es mayor que el de homocigocidad. De aquí, la enorme importancia de conocer la distribución de alelos y genotipos de la población en la que se investiga y de acuerdo a la genética poblacional de un banco de datos representativo, calcular la fiabilidad de la técnica³⁷.

6. 4. 1. EXTRACCIÓN DIFERENCIAL DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS COMBINADAS (SEMEN - SANGRE; SEMEN - CÉLULAS DE DESCAMACIÓN).

1. Colocar una porción de la mancha de 25mm², en 1 ml de agua destilada, incubar a 37°C durante 1 hora, agitando periódicamente mediante vórtex.
2. Retirar la tela con un tip o un palillo de dientes autoclavado y centrifugar a 13,000 rpm, recuperar el sobrenadante que tiene las células.
3. Digestión del material de la víctima con proteinasa K/ SDS/ TEC e incubación durante 2 horas a 56°C. La solución se prepara con: EDTA 10 mM, Tris 10 mM, NaCl 100 mM, a ésta añadir SDS 1% y 10 a 20 µl de proteinasa K.
4. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante que contiene el DNA de la víctima.
5. El precipitado del paso anterior contiene los espermatozoides del agresor. Se resuspende nuevamente en pK / SDS / TEC.
6. Añadir 10 µl de DTT e incubar durante 12 horas a 56°C.
7. Luego con los dos líquidos se procede a las extracciones con solventes orgánicos (fenol / cloroformo-isoamílico) y precipitar el DNA de ambos en etanol absoluto.
8. En caso de tratarse sólo de muestras de semen no se realiza la separación del material de la víctima.

6. 4. 2. EXTRACCIÓN ORGÁNICA y SEPARACIÓN DE DNA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS y CÉLULAS VAGINALES

1. Colocar la muestra problema con semen en un tubo de 1.5 ml (pedazo de hisopo de algodón, o tejido manchado cortado).
2. Añadir la Solución de Separación A (SSA)

400 µl de	Tris /EDTA /NaCl
25 µl de	sarkosyl
75 µl de	agua
5 µl de	proteinasas K (20 mg/ml)

3. Mezclar el contenido del tubo con agitación suave e incubar a 37°C durante 2 horas.
4. Hacer un agujero en la tapa del tubo (liberar gases). Transferir el material dentro del tubo y centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm.
5. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo de 1.5 ml. Ésta es la fracción que contiene el DNA de las células lisadas (denominarla Fracción Femenina).
6. Retirar el substrato que queda y colocarlo en otro tubo. Ser cuidadoso de no tocar el pellet que queda en, el fondo del tubo original
7. Añadir al pellet (Fracción Masculina) en el tubo original la Solución de Separación B (SSB):

150 µl de	Tris /EDTA /NaCl
50 µl de	sarkosyl al 20%
40 µl de	DTT 0.39 M
150 µl de	agua
10 µl de	proteinasas K (20 mg/ml)

8. Mezclar suavemente el contenido del tubo e incubar durante 2 horas a 37°C.

9. Agregar al pellet 500 μ l de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1); realice el paso dentro de una campana de extracción de gases.
10. Mezclar con vórtex durante 20 segundos hasta que la emulsión se vuelva «lechosa». Al final un Spin a gran velocidad durante 2 minutos en una microcentrífuga.
11. Se pueden realizar más extracciones orgánicas sucesivas para purificar la muestra, hasta un máximo de tres veces.
12. Retirar el estrato acuoso (Fracción Masculina) del tubo inicial y colocarlo en un nuevo Eppendorf de 1.5 ml. Trotar de no remover la capa proteica desnaturalizada que se formó en la interfase entre el agua y las capas orgánicas.
13. Añadir a la capa acuosa 10 ml de Etanol Absoluto a -20°C .
14. Mezclar manualmente y colocar el tubo a -20°C durante 30 minutos.
15. Centrifugar durante 15 minutos a 12,000 rpm.
16. Decantar y eliminar el alcohol.
17. Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente.
18. Centrifugar 5 minutos.
19. Decantar y eliminar el alcohol. Retire el alcohol remanente con una micropipeta.
20. Centrifugar nuevamente durante 30 minutos, luego retirar el alcohol remanente.
21. Resolubilizar el DNA en 36 μ l de TBE a 56°C al menos 2 horas. Se puede dejar el DNA durante toda la noche a 56°C .
22. El DNA sustraído pertenece a la Fracción Masculina.

6. 4. 3. EXTRACCIÓN DIFERENCIAL DE DNA ESPERMÁTICO

DIGESTIÓN DEL MATERIAL CONTAMINANTE

1. Colocar una porción de la mancha de 25 mm² con una Solución de Extracción, incubar a 37°C durante 30 minutos, agitando periódicamente mediante vórtex.
2. Preparar la solución:
Tampón de Extracción + SDS al 2% + Proteinasa K 30 µl (20mg/ml).
3. Preparar el tampón con:

Tris 0.01 M	1.21 g/l
EDTA disódica 0.01 M	3.72 g/l
NaCl 0.1 M	5.84 g/l
SDS al 2% p/v, pH 8	
4. Preparar el tampón cada semana y guardarlo a temperatura ambiente.
5. Después de esta corta incubación, perforar el fondo del tubo con una aguja caliente y centrifugar la mezcla con un Spín corto. Todas las muestras deben estar en tubos Eppendorfs etiquetados. Asegurarse de perforar la tapa del tubo primero para prevenir que el contenido sea expulsado por el fondo del tubo por la presión ejercida por los gases.
6. Centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 14,000 rpm en una microcentrífuga.
7. Retirar el sobrenadante del extracto y lavar el pellet 3 veces en SDS/Tampón de Extracción. Luego centrifugar con un spin a 14,000 rpm. El sobrenadante contiene el material de la víctima, el pellet el DNA del sospechoso.
8. Tomar la precaución de guardar todos los tubos utilizados en una bolsa y congelar a -20°C puede ser que se requiera nuevamente su uso ya que contienen residuos del material extraído.

9. Añadir la solución de extracción nuevamente al pellet, como se describió antes, e incubar toda la noche a 37°C El pellet contiene el DNA del sospechoso.

PURIFICACIÓN CON FENOL / CLOROFORMO

Ésta es la técnica estándar de extracción de DNA de sangre.

10. Retirar con una pinza estéril autoclavada los tejidos (ropa) u otros materiales que contenga el tubo. Se pueden utilizar palillos de dientes autoclavados para evitar contaminación.
11. Hacer un agujero en el fondo del tubo con aguja desechable caliente; hacer lo mismo con la tapa (con el objeto de liberar la acumulación de gases de la noche). Se puede perder una parte del extracto durante la perforación.
12. Numerar un segundo set de tubos Eppendorf. Colocar firmemente el tubo perforado dentro del nuevo tubo. Siempre adopte el procedimiento: perforar el tubo, colocarlo en el tubo receptor, colocar la pareja en la centrífuga y entonces centrifugar.
13. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
14. Colocar los tubos con el extracto en una gradilla. Tomar otra gradilla para colocar los tubos con fenol/cloroformo (F/C). Añadir 200 µl de solución de F/C a los tubos con el extracto, cierre cuidadosamente cada tubo. Mezclar con vórtex.
15. Se puede preparar de forma casera (in house) la solución de F/C o adquirir preparaciones comerciales listas. Citamos aquí como preparar la solución de fenol/cloroformo con:

Fenol sólido	500 g
Cloroformo	500 ml
Alcohol isoamílico	20 ml
8- Hdroxiquinolina	0.5 g

Dejar toda la noche a temperatura ambiente para disolver. Añadir suficiente Tris/HCl 0.1M (pH 8) hasta el filo del contenedor y agitar suavemente para equilibrar el fenol. Permitir que las capas se separen. Retirar la capa acuosa superior y descartar. Lavar dos veces más con Tris/HCl. Medir el pH del sobrenadante, debe estar entre 7.5 y 8.0. Si no es así continuar lavando hasta alcanzar el pH necesario.

16. Verificar que el contenido del extracto con la solución de F/C esté bien mezclado. Puede utilizar un agitador a velocidad máxima unos 30 minutos. Lo importante es obtener una emulsión de las capas acuosa/orgánico que facilitará la eliminación de proteínas contaminantes. Se puede realizar agitaciones de forma manual con períodos de 30 segundos.
17. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 14,000 rpm. Retirar la capa acuosa superior y colocarla en otro tubo Eppendorf rotulado. Cuidar de no llevar el estrato orgánico.
18. En ocasiones, cuando la muestra en estudio proviene de escenarios muy contaminados, es difícil realizar el paso anterior porque la solución siguiente a la interfase es muy viscosa probablemente sean complejos proteicos de DNA. No descartar esta fase.
19. Se pueden realizar hasta 3 lavados con F/C, pero bastan 2 veces para encontrar una cantidad aceptable de producto. Considerar que con cada extracción hay una pérdida irrecuperable de DNA.

RECUPERACIÓN DEL DNA

20. Si existe alguna razón para creer que la cantidad de DNA es muy pequeña (entre 1 μ l y 10 pg/ml), agregar 1 μ l (20 μ g) de Glicógeno (Boheringer, Cat. 901393), por cada tubo Eppendorf que contenga un volumen aproximado de la muestra de 500 μ l. Mezclar con una pipeta suavemente.
21. Luego añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Congelar la mezcla y después seguir con el protocolo normal. Considerar que la recuperación del DNA por el glicógeno solo se logra en conjunto con la precipitación por etanol absoluto⁴⁴.

6. 5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DNA UTILIZADOS PARA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA EN EL ÁMBITO FORENSE EN MÉXICO (1990 – 2003)

Proceso de las muestras:

1. Recepción de las muestras.
2. Manejo de muestra
3. Extracción de DNA.
4. PCR setup.
5. Tipificación del DNA.

Cada una de ellas se lleva a cabo en áreas físicamente separadas y en el orden en que se maneja la muestra.

1. Recepción y registro de muestra. Se decide si la muestra se recibe o no, de acuerdo a las condiciones de ésta, etiqueta, embalado, etc. Se registra en un libro de gobierno con todos los datos: número de averiguación previa, folio, etc.
2. Manejo de muestra. Elección de las muestras a manejar, fijación fotográfica, dosificación de la muestra y en el caso de ropas se recorta la zona.
3. Extracción de DNA. La extracción técnica depende del tipo de muestra y de la extracción que se realizara.
 - a) Técnica de extracción orgánica.
 - b) Técnica de extracción inorgánica.
 - c) Técnica de extracción mediante kits comerciales (orgánica e inorgánica).

a) Técnica de extracción orgánica. Utilizada para tejidos parcialmente degradados, huesos. Basada en una digestión proteica de membranas celulares y separación de DNA por gradiente de solubilidad, en una extracción líquido-líquido.

- En un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad se coloca 10 μ l o 0.1g de muestra y 500 μ l de la mezcla de extracción/digestión: buffer pH=8, EDTA, proteinasa K, detergente SDS.

- Incubar de 2 a 24 horas, a 56°C, moviendo constantemente, hasta que el tejido este en solución.
- Purificación. A 200µl del DNA digerido se le agregan 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 20:20:10. mezclar para formar una suspensión.
- Centrifugar a 3,000 rpm por 3 minutos para separar las fases: superior acuosa que contiene el DNA, interfase proteica, inferior orgánica.
- Se separa la fase acuosa y se le adicionan 2 volúmenes de alcohol etílico. Mezclar. En esta fase ocurre la precipitación del DNA.
- Bajar la temperatura a 4°C y permitir la precipitación del DNA.
- Filtrar sobre papel y lavar con alcohol etílico al 70%.
- El DNA contenido en el papel filtro se resuspende en agua libre de nucleasas (por ej. Agua inyectable) o buffer. Esta se lleva a PCR.

b) Técnica de extracción inorgánica. Técnica Chelex. Se utiliza para muestras de saliva, sangre, semen, pelo. Generalmente esta basada en el uso de resinas quelantes, que contienen afinidad por iones metálicos y polivalentes, contienen grupos que actúan como grupos quelantes. El DNA se pega a la resina por carga específica del DNA (negativa).

1. Colocar 1 ml de agua libre de nucleasas estéril, en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Adicionar 10 microlitros de muestra al tubo.
3. Mezclar con vortex durante 20 seg.
4. Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 20 min.
5. Centrifugar a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 3 min.
6. Eliminar el sobrenadante, con mucho cuidado para evitar eliminar el pelet, que podrá ser visible en el fondo del tubo.
7. Lavar el pelet con el agua de la solución de chelex, dos veces.
8. Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar el pelet.
9. Adicionar 200 microlitros de una solución de chelex al 5%, agitar suavemente.

10. Incubar la muestra a 56 °C durante 30 min.
11. Agitar en vortex suavemente durante 5-10 seg.
12. Incubar la muestra en agua hirviendo durante 8 min. agitar suavemente en vortex durante 5-10 seg.
13. Centrifugar la muestra a 14000 rpm durante 3 min.
14. La muestra está lista para ser amplificada por PCR.
15. Almacenar a 4 °C por periodos cortos o a -20°C por largos periodos.

Nota: Las extracciones diferenciales para exudados vaginales se realizan por gradientes de temperatura y buffer de extracción. Primero se rompen las células vaginales a 56°C por 10 minutos, se hace la lisis y se preparan frotis para observar si todavía hay células vaginales; después cuando ya estamos seguros de que solo hay espermatozoides se hace el proceso de extracción de DNA para estos.

c) Técnica de extracción por medio de kits comerciales. Están basados en la afinidad eléctrica del DNA (cuya carga es negativa), mediante una resina magnética (cargada positivamente), para formar un complejo (resina – DNA) y con la ayuda de una barra imantada se hace posible la extracción del DNA.

Ejemplo DNA – IQ para muestras fijadas en telas.

- El kit contiene:
 - Buffer de lisis (100µl de buffer + 1µl de DTT), Buffer de lavado, buffer de elusión, Resina, Barra imantada en base para tubos.
- Se coloca la muestra en el tubo (tela 1cm X 1cm), se agrega 200µl de buffer de lisis, agitar.
- Incubar 30 minutos a 56°C. Retirar el soporte de la muestra (tela).
- Agregar 7µl de resina. Incubar 1 hora a 56°C.
- Se coloca en la barra imantada, se elimina el sobrenadante.
- Se retira de la barra, agregar 100 - 200µl de buffer de lavado.
- Colocar en la barra imantada, eliminar sobrenadante
- Se realizan 3 lavados, de igual forma.

- Retirar de la barra, eliminar el sobrenadante a sequedad.
- Agregar 50µl de buffer de elusión.
- Calentar 2 minutos a 96°C, para separar el DNA de la resina.
- Regresar a la barra magnética de inmediato para evitar que se unan otra vez.
- En la solución sobrenadante se encuentra suspendido en DNA. Debe pasarse aun tubo limpio. 2-10µl se llevan a PCR.

RFLP's Fragmentos de Restricción de Longitud Polimorfica.

Generación de fragmentos de diferente longitud, a través de la digestión enzimática con enzimas de restricción, las cuales cortan al DNA en sitios específicos cada vez que encuentran una determinada secuencia de bases (aproximadamente 200 – 300 pares de bases).

PASOS DE LA TÉCNICA:

- Extracción del DNA
- Digestión y ruptura del DNA (por medio de las diferentes enzimas)
- Separación electroforetica de los fragmentos (agarosa al 4%)
- Desnaturalización de la cadena (separar cadenas)
- Transferencia a una membrana
- Hibridación de los fragmentos con sondas específicas (kits comerciales)
- Detección de los productos híbridos (quimioluminiscencia o autorradiografía)

VENTAJAS:

1. Gran polimorfismo estadístico. La posibilidad de que dos personas tengan bandas iguales, es de 1 entre 250, así si se analizan un número

mayor de loci, la probabilidad se eleva progresivamente hasta llegar a 1 entre 1 billón si se analizan 20 loci.

2. Requiere DNA integro de alto peso molecular. Esto asegura a su vez la calidad del material genético.

DESVENTAJAS:

1. Requiere DNA integro. Es decir de alto peso molecular. En genética forense esto es un inconveniente por el tipo de muestra que se maneja: parcial o muy degradadas.
2. Cantidad de DNA requerido. En el ámbito forense, generalmente los indicios se presentan en cantidades muy pequeñas.
3. Complejidad de la técnica.

Los kits presentes en el mercado son:

1. HLA – DQA1	1 loci (marcador)	Salió del mercado en Dic. de 2002
2. POLIMARKER	5 loci	Salió del mercado en Dic. de 2002
3. DS1S80	2 loci	PCR y Separación electroforética
4. D17S5	2 loci	PCR y separación electroforética

En las dos primeras técnicas se podían detectar polimorfismos específicos de alelos, utilizando sondas ASO (secuencias pequeñas conocidas), las cuales en condiciones adecuadas se unen a secuencias de DNA que contienen su secuencia complementaria.

En tiras de nylon se fijan sondas ASO. El DNA extraído se ponía en contacto con estas tiras (buffer y temperatura adecuadas) para que se hibridaran y donde esto ocurría se producía un color que permite ver el lugar de hibridación como un punto.

En la tercera y cuarta técnica después de la extracción, se utiliza la PCR para la replicación del material genético, seguido de los pasos antes mencionados para RFLP's, es decir la utilización de enzimas restrictoras, electroforesis en gel, y los marcadores comerciales. Estas técnicas están actualmente en huso sobre todo en medicina e investigación; en genética forense ya no se usan, han sido remplazadas por los STRs.

PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, es un proceso In Vitro que permite incrementar la cantidad de un fragmento pequeño de DNA previamente seleccionado. Puede ser considerado como proceso de "fotocopiado molecular".

Los componentes básicos del proceso analítico son:

1. DNA problema
2. Primers (oligonucleotidos, secuencias de DNA pequeñas y conocidas)
3. Buffer
4. Enzima (mas usada: Taq polimerasa)
5. dNTP's (deoxinucleotido trifosfatos)
6. Termociclador

Etapas de la PCR por ciclo:

1. Desnaturalización. La doble cadena se separa en dos cadenas simples (95°C ó álcalis).
2. Emparejamiento o annealing. Las cadenas se vuelven a unir, de acuerdo al principio de complementariedad de bases (62 – 65°C). El menor peso molecular de los primers, le da una ventaja de unión en comparación con toda la cadena complementaria que ya no se une a su pareja porque ya esta ocupada por los primers.
3. Extensión. Se incrementa la temperatura a 72°C donde la Taq polimerasa tiene su mayor actividad. Su función es dar a la cadena complementariedad, es decir tomar los nucleótidos del medio y "llenar" los huecos que dejan los primers para obtener una doble cadena completa a partir de una cadena sencilla unida a primers.

En la practica son 32 ciclos lo que nos da 1.07 billones de copias de la región que se halla seleccionado con los primers.

VENTAJAS:

1. Amplificación de indicios muy pequeños
2. PCR multiplex, permite trabajar con 16 loci tipo STR's en una sola secuencia de PCR (al mismo tiempo)
3. Análisis de indicios degradados
4. Tiempo
5. Detección no radiactiva (actual fluorescencia)
6. Facilidad de interpretación (en forma de picos en la pantalla del aparato)
7. Disminución de probabilidad de error (menor manipulación)

DESVENTAJAS:

1. Amplificación de contaminación biológica
2. Inhibición de la PCR
 - iones metálicos (exhumación)
 - Tintes de cabello (varía)
 - Tratamiento de telas (mezclilla)

En la actualidad por medio de la técnica de Multiplex PCR, se obtiene la amplificación de hasta 16 marcadores en una sola reacción, con una sensibilidad de menos de 1 ng de DNA para iniciarla y pudiéndose tratar de muestras degradadas.

STRs Short Tandem Repeats

Son microsatélites que están compuestos por secuencias repetidas en tandem cada una de las cuales tiene entre 2 y 7 pares de bases de longitud.

Son sumamente polimórficas si se utilizan 16 STRs se obtiene un 99.99% de posibilidades de identificar a un individuo, siempre teniendo con que compararlo: muestra de referencia.

La técnica se puede realizar de forma manual por electroforesis en gel, o automatizada por electroforesis capilar.

Los kits en el mercado son:

	Marcadores	Fabricante
1. COFILER PLUS	6 loci	Applied Biosystem
2. PROFILER PLUS	9 loci	Applied Biosystem
3. IDENTIFILER	16 loci	Promega Corporation
4. POWER PLEX 16	16 loci	Promega Corporation

El uso de uno u otro depende del tipo de muestra y el poder de comparación que se necesite. Por ejemplo en una muestra de tejido óseo es más probable poder replicar 9 marcadores que 16 por el estado de degradación del material genético; mientras que en los casos de paternidad se utilizan siempre 16 marcadores, porque el estado y cantidad de la muestra son óptimos y el poder de discriminación requerido es muy alto.

PASOS DE LA TÉCNICA:

- Extracción del DNA
- Replicación por PCR
- Manual: electroforesis en gel
Automatizado: electroforesis capilar
- Contacto con marcadores comerciales

- Manual: detección de bandas de fluorescencia

Automatizado: obtención de Electroferograma

La determinación en todos los casos se hace con fluorescencia, cuando se hace de forma automatizada cada determinación requiere aprox. 32 minutos por muestra con 16 marcadores (loci), los resultados se emiten en forma de Electroferograma (detección de fluorescencia en forma de picos)⁴⁵.

MEZCLAS:

En la interpretación del número de bandas en la electroforesis o picos en el electroferograma, se observan 4 posibles bandas o señales para cada uno de los marcadores (loci). Pero como es sabido cada individuo posee solo dos alelos para una determinada característica, uno heredado del padre y uno de la madre, es decir, para un solo individuo se observaría una banda en el caso de los homocigotos (dos alelos del mismo tipo), y dos bandas para los heterocigotos.

Cuando en el resultado de alguno de los marcadores se observa más de dos señales (3 ó 4) estamos sin duda ante casos especiales, algunos de los cuales se mencionan brevemente a continuación:

Víctima y sospechoso

La interpretación de las muestras depende en mucho de las circunstancias que rodean el delito, como primer ejemplo están aquellas en donde se justifica que el DNA de la víctima este presente, como es el caso de las muestras obtenidas en una violación (ignorando la posibilidad de una extracción diferencial del DNA de esperma y células epiteliales), asumiendo que la víctima no tuvo contacto con DNA de otro individuo. Se plantean para cada uno de los casos dos hipótesis.

Mezcla de cuatro alelos:

Víctima	Sospechoso	Muestra
	A ₁ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₁
	A ₂ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₂
A ₃ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> A ₃
A ₄ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> A ₄

H₁: La muestra del delito contiene DNA de la víctima y del sospechoso.

H₂: La muestra del delito contiene DNA de la víctima y de otra persona.

En este caso como en todos los demás donde hay una mezcla, el dictamen se basa en las probabilidades estadísticas de que los marcadores presentes que no pertenecen a la víctima, pertenezcan o no al sospechoso, con un determinado porcentaje de probabilidad, de acuerdo al numero de marcadores coincidentes y la probabilidad de encontrar estos en el resto de la población. Pero si se encuentra un marcador que no pertenece a la víctima ni al sospechoso, esto excluye a este.

Mezcla de tres alelos:

Víctima	Sospechoso	Muestra
	A ₁ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₁
	A ₂ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₂
A ₃ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> A ₃

Es el mismo caso que el anterior pero la víctima presenta alelos iguales, es homocigoto.

Mezcla de tres alelos:

	Víctima	Sospechoso	Muestra
	A ₁ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	A ₁
A ₂ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	A ₂
A ₃ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	A ₃

En este caso el homocigoto es el sospechoso.
Sospechoso y alguna otra persona.

Cuando se descarta la posibilidad de que la muestra contenga DNA de la víctima, pero los marcadores muestran 3 ó 4 alelos y se tenga solo un sospechoso, se analiza ésta en comparación con el DNA del sospechoso y se obtienen las hipótesis respectivas.

Mezcla de cuatro alelos:

Sospechoso	Muestra
A ₁ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₁
A ₂ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₂
	<input type="checkbox"/> A ₃
	<input type="checkbox"/> A ₄

H₁: La muestra del delito contiene DNA del sospechoso y de otra persona.

H₂: La muestra del delito contiene DNA de otras dos personas.

Mezcla de tres alelos:

Sospechoso	Muestra
A ₁ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₁
A ₂ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₂
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₃

Este resultado muestra un sospechoso heterocigoto y el material genético de otra persona homocigoto. En el caso contrario se mostraría solo una banda perteneciente al sospechoso y tres bandas en la muestra.

Dos sospechosos

Esta situación se presenta cuando una muestra es comparada con dos sospechosos de un delito como es el caso en donde las circunstancias del hecho hacen suponer la participación de dos personas, un ejemplo de estos delitos, es la violación tumultuaria, en donde el contenido vaginal de la víctima puede contener el DNA de ambos sospechosos, descartando por extracción diferencial el DNA propio de la víctima.

Mezcla de cuatro alelos:

Sospechoso 1	Sospechoso 2	Muestra
	A ₁ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₁
	A ₂ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> A ₂
A ₃ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> A ₃
A ₄ <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> A ₄

En donde se proponen tres hipótesis:

- H₁: La muestra del delito contiene DNA del sospechoso 1 y del sospechoso 2.
- H₂: La muestra del delito contiene DNA del sospechoso 2 (o del 1) y de otra persona.
- H₃: La muestra del delito contiene DNA de otras dos personas⁴⁶.

En todos los casos (los aquí mostrados son solo algunos) se debe recordar que finalmente la prueba de DNA es siempre un proceso de comparación y su utilidad reside en esto y en tener una muestra de referencia para emitir un resultado; esto se complica grandemente cuando la muestra contiene material genético de mas de una persona sea la víctima, otro sospechoso o cualquier otra persona que pudo haber estado en contacto con la misma antes o después de recogida la evidencia.

6. 6. ETAPAS DE LA PRUEBA DEL DNA EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA FORENSE

La prueba del DNA aplicada a criminalística tiene, como se ha visto hasta ahora, cuatro etapas básicas:

1. Análisis laboratorial de la muestra, lo que incluye analizar el mayor número de polimorfismos DNA posible, obteniendo así un perfil genético de la muestra objeto de análisis (p, ej. puede concluirse que la muestra posee los grupos HLA DQA1 3-4, TH01 8-10, FES 8-11 y VWA, 16-20).
2. Comparación de los resultados con los obtenidos en el inculpado o en la víctima. Ello implica que si aparece un vestigio biológico en la víctima se compara con el análisis genético del agresor, o si por ejemplo aparece una mancha de sangre en el agresor se compara con la sangre de la víctima.
3. Puede ocurrir que los patrones sean diferentes en uno o más grupos con lo que se concluirá que ese vestigio biológico no se corresponde con el individuo con el que se compara.

Pero puede suceder que los polimorfismos DNA analizados en el vestigio se correspondan con el individuo con el que se compararán. Entonces hay que valorar la probabilidad de que ese vestigio provenga de ese individuo, lo que depende de la frecuencia de esos grupos en la población. La tercera etapa del análisis es, pues, la valoración probabilística de la prueba en el caso de coincidencia de patrones.

4. Por último, la emisión del correspondiente informe medicolegal y, en su caso, la comunicación de los resultados en el juicio oral.

Estas etapas de análisis laboratorial que concluyen en el informe medicolegal tienen un precedente básico que es la correcta recogida y envío del vestigio al laboratorio. Estos aspectos han cobrado una importancia considerablemente mayor porque el valor de la prueba es, en ocasiones, trascendente. Así, aspectos frecuentemente descuidados, como la denominada «cadena de custodia» del vestigio, han pasado a tener una enorme importancia²⁴.

En el informe o dictamen se debe entregar al ministerio público una descripción general de la muestra y los procedimientos a los que fue sometida así como los resultados que de ellas se derivan, la correspondencia entre dos muestras de DNA se evalúa matemáticamente por medio de modelos estadísticos que relacionan la concordancia entre ellas y las posibilidades de que ésta se dé entre dos individuos cualquiera de la población. El responsable del estudio debe explicar el significado de estos lo mas claramente posible para lo cual se puede auxiliar de los predicados de Humeel una vez que el sistema a determinado la probabilidad.

PREDICADOS DE HUMEEL⁴⁵

99.73 %	CORRESPONDENCIA "PRÁCTICAMENTE PROBADA"
99 a 99.72 %	CORRESPONDENCIA "EXTREMADAMENTE PROBADA"
95 a 98.99 %	CORRESPONDENCIA "MUY PROBABLE"
90 a 94.99 %	CORRESPONDENCIA "PROBABLE"
50 a 89.99 %	CORRESPONDENCIA "MAS PROBABLE QUE NO"
10 a 49.99 %	"NO-CORRESPONDENCIA, MAS PROBABLE QUE CORRESPONDENCIA"
5 a 9.99 %	CORRESPONDENCIA "IMPROBABLE"
1 a 4.99 %	CORRESPONDENCIA "MUY IMPROBABLE"
MENOR A 0.99 %	CORRESPONDENCIA "PRÁCTICAMENTE EXCLUIDA"

Del mismo modo, dada la relevancia que la prueba posee en los delitos contra la libertad sexual, el hecho de que se analice el esperma en un porcentaje mínimo de los delitos denunciados y que no llegue muchas veces en buenas condiciones a los laboratorios forenses debería ser inmediatamente corregido²⁴.

Queda además pendiente la discusión de la legislación referente al manejo y propiedad de la información genética, pues hasta el momento en nuestro país no existe esta regulación y es una deficiencia a nivel mundial.

De seguir esta situación nos veremos en el mismo caso de la reciente descifración del genoma humano, ¿A quien pertenece esa información?. Cabe señalar que si se radicaliza la autonomización del genoma el poder se incrementara a niveles enormes, de modo que la libertad de quienes lo dominan derivara en la negación general de la libertad de los dominados. Los riesgos para la autonomía invocados por el sistema económico se multiplicaran, por que el poder genético parece ser incomparablemente más grande que el económico y además, este puede ser quien al fin controle el poder genético. Se reuniría un enorme poder para los actuales poderosos de la economía⁶¹.

6. 7. RECOMENDACIONES BÁSICAS PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

La CONTAMINACIÓN implica transferencia accidental de un DNA extraño a una muestra problema. Muestra problema es aquella que pretendemos analizar. Esta situación puede darse en dos momentos:

- a) En el laboratorio donde veremos contaminación cruzada y,
- b) Contaminación asociada a la escena del crimen.

La primera ocurre como resultado de transferir un DNA externo a una reacción determinada, que resulta en una mezcla inexplicable o en un resultado confuso. La posibilidad de este tipo de contaminación se minimiza al tomar las siguientes medidas:

1. El laboratorio debe tener un diseño interior en el cual exista separación física de los procedimientos, con al menos 3 áreas separadas: una para la extracción de DNA, la segunda para amplificación (de preferencia un cuarto aislado) y, una tercera, para el análisis de los productos de la PCR. Mientras más aparataje mayores son las necesidades de espacio físico.
2. Todo el personal que trabaje en el laboratorio (técnico, administrativo y mantenimiento) debe estar genotipado, de tal manera que se pueda comprobar la existencia de contaminación por manipulación, en cualquier momento.
3. El personal técnico debe utilizar siempre material de protección como guantes de látex, mascarilla, gafas de protección y mandil; tanto por evitar riesgo de infecciones como por proteger las muestras de nuestro propio material genético.
4. Tratar siempre de trabajar con la menor cantidad de instrumental posible, mientras menos instrumentos y material utilizado, esto incluye simplificar los procesos con menos pasos, menor es el riesgo de contaminación de las muestras.

5. Durante la extracción de DNA utilizar una cámara de filtración de gases, con el fin de evitar la contaminación aérea. Además, sirve para proteger al personal de posibles inhalaciones tóxicas.
6. En todos los procesos realizar TUBOS BLANCO que se corren paralelamente a la muestra problema, sin el DNA en estudio. Cuando se cuantifique por espectrofotometría no debe existir presencia de DNA, aunque algunos autores sugieren que se pueden aceptar cantidades aceptables mínimas de material genético en el blanco, siempre y cuando no supere el 10% de la cantidad medida. Luego, de amplificar, es deseable que tampoco exista material genético en los geles de agarosa. Se recomienda repetir todos los procedimientos cuando sea necesario.
7. Incluir CONTROLES POSITIVOS en los geles, la amplificación positiva debería dar una banda brillante en el gel de agarosa, La ausencia de esta banda invalida todas las muestras asociadas al set de amplificación. Repetir el procedimiento cuando sea posible.
8. Incluir también CONTROLES NEGATIVOS. Como en el numeral anterior pero no debe haber amplificación del control. Si se observa una banda no necesariamente se invalida el estudio. Se debe secuenciar la muestra para determinar el origen de la contaminación y evidenciar los posibles errores. Repetir la amplificación cuando sea necesario.
9. Cuando se amplifica no deben transcurrir más de 30 minutos desde que se prepara el master mix hasta llevar las muestras al termociclador. Al contrario, todos los procesos llevan un tiempo determinado, el hacer las cosas muy rápidamente puede desembocar en errores de contaminación.
10. No trabajar con grandes diluciones, mientras más pequeñas las cantidades con las que se trabaje menores riesgos de contaminación.
11. Tratar de evitar los errores de pipeteo, cuando los volúmenes son demasiado pequeños agrandar el número de muestras.
12. No utilizar toda la muestra original, guardar un poco por si se necesita en lo posterior.

La contaminación asociada al crimen puede ocurrir por dos maneras:

Transferencia pasiva, condición producida por una transferencia accidental de DNA externo a la muestra problema, que podría estar restringida al período inmediato luego de suscitado el crimen; un ejemplo, durante la recolección de las muestras por el personal de investigadores. Este tipo de transferencia puede deberse a la presencia externa de saliva, estornudos, tos, sudoración, transpiración, manipulación durante su transporte, entre otros posibles eventos. Es una situación inusual pero que puede ocurrir; se conoce que la cantidad de DNA transferido es muy bajo.

Transferencia relevante al caso, ocurrida en ese sutil período de tiempo donde se perpetra un hecho criminal y cuando se está en contacto con el sospechoso, aunque no necesariamente se restringe tan sólo a esa etapa. En esta situación, durante la tipificación de perfiles genéticos, y en particular cuando se trata de manchas, podemos obtener un perfil diferente al sospechoso. Debido a esto necesitamos considerar las implicaciones de la presencia de una cantidad de DNA desconocido, el cual hace también sospechosa a la víctima. Tenemos dos posibilidades:

1. Que el DNA que fue transferido durante el curso del crimen sea de un perpetrador diferente al sospechoso, o
2. Que el DNA fue transferido antes o después del crimen y que por lo tanto, fuera de otro individuo.

Para resolver este problema inicial podemos tipificar el sustrato como un control negativo. El SUSTRATO es una zona adyacente al área del crimen, periférica, limitada por un fluido corporal dado. Al analizar esta zona, que podría ser de algún tipo de tejidos, podríamos encontrar:

1. Un perfil genético igual al del sospechoso con lo cual resolvemos el problema.
2. En su defecto no encontrar nada que también resuelve el asunto.

3. Por el contrario, encontrar nuevamente un perfil genético distinto al del sospechoso, con la práctica nos volvemos a encontrar ante dos condiciones, que el DNA encontrado sea de un perpetrador desconocido al crimen o, que el perfil resulte de la transferencia pasiva de cualquier otro individuo desconocido, que será inocente.

Ante este dilema podemos inferir dos conclusiones: primera, si los resultados han ocurrido como resultado de una transferencia pasiva entonces la evidencia todavía apoya la hipótesis que el DNA actualmente originado sea del sospechoso, aún bajo las circunstancias asociadas al hecho. Segunda, si la mancha de la muestra problema analizada ha sido de esperma, sangre o saliva, debemos realizar nuevas pruebas para reconfirmar cual es el tipo biológico de fluido que estudiamos. De esta manera, al no coincidir el tipo de fluido de la mancha con el de la muestra problema, descartaríamos al individuo inocente.

En conclusión podemos decir que generalizar es siempre difícil porque las circunstancias de cada caso son diferentes. La evidencia es solamente útil si es relevante al caso. No olvidar que en criminalística siempre existe la posibilidad de transferencia pasiva o de transferencia de un individuo ajeno al hecho, y que desde luego será inocente. Simplemente porque el perfil del DNA concuerda con un sospechoso, no significa que haya sido transferido durante el curso del crimen⁴⁴, en cualquier caso el trabajo del químico concluye aquí, brindando herramientas para que el juez determine la inocencia o culpabilidad del acusado y se llegue por medio de la ley a la justicia.

CONCLUSIONES

El acto sexual es una necesidad y un derecho del ser humano, en donde se relaciona física y/o emocionalmente con otro individuo, sin embargo este como todos los demás derechos termina donde empieza la libertad de decisión y acción del otro, es decir nadie debe ignorar la decisión de la otra persona a ser o no involucrado en actos de índole sexual. Las personas que socialmente no se consideran capacitadas para tomar esta decisión son protegidas por el estado y la sociedad con la creación de leyes.

Los delitos sexuales, se convierten en nuestros días en los actos más atroces y menos castigados. La víctima de un delito sexual se convierte también en víctima del sistema de justicia, quizás bien intencionado, pero con grandes deficiencias; en víctima de la sociedad, que lejos de ayudar y apoyar, juzga, pone en duda, investiga y califica, humilla y condena, pero que se lava las manos con la creación de leyes apropiadas, que por desgracia, se aplican en muy pocas ocasiones.

Sin embargo, no todo está perdido, se trabaja día a día para hacer un cambio, los médicos y psicólogos humanizando el trato a la víctima, los licenciados buscando nuevas herramientas para la aplicación de la ley, la policía tratando de cubrir la demanda de atención de los ciudadanos, los educadores y luchadores sociales creando conciencia de la magnitud del problema, y desde nuestra trinchera los servidores de la ciencia en una carrera contra la impunidad, buscamos nuevas y mejores técnicas, para apoyar con el granito de arena que nos toca, en la impartición de justicia.

Los peritos químicos, de campo y de laboratorio, deben por necesidad auxiliarse de los recursos más útiles, rápidos y confiables en el ejercicio de su labor, pues de los resultados que obtienen depende en gran medida que una persona sea encarcelada o puesta en libertad.

En el ámbito forense el análisis de semen, su identificación y la obtención de información genética, son de gran importancia. Conforme los conocimientos avanzan, las técnicas se modernizan y se sustituyen unas por otras, algunos ejemplos son los siguientes:

- Las pruebas cristalográficas son poco prácticas y poco específicas, debido a lo cual ya no se utilizan.
- El uso de la Lámpara de Wood se confirma por la facilidad de su manejo y bajo costo, como prueba de orientación, demostrando su utilidad sobre todo en la investigación de campo.

- La mejor y más útil prueba de presunción en la investigación de manchas de semen es la técnica de la Fosfatasa Ácida, con sus variantes y modificaciones según las condiciones de la muestra.
- La prueba de certeza “reina” para la demostración de semen, es la presencia de células espermáticas evidenciadas a través de tinciones, de entre las cuales la de uso mas extendido en el área forense en nuestro país es la técnica de Christmas Tree, por su relativa sencillez y excelente definición en la observación de espermatozoides.
- La determinación del grupo del sistema ABO en manchas de semen (al igual que en otros fluidos biológicos) es a la vez una prueba de diagnóstico individual y de especie, con mayor valor de exclusión que de inclusión, es decir si el resultado de un sospechoso no coincide con el de la muestra problema puede excluirse la culpabilidad de este; pero si coinciden, por ese solo hecho no puede asegurarse su participación en el delito.
- La aplicación de la genética en los procesos judiciales ha venido a cubrir este hueco, con las técnicas de obtención, replicación y tipificación del DNA se ha dado un paso importantísimo en la identificación de las personas, y contando con muestras de referencia se puede decir con gran seguridad si un determinado indicio coincide con una persona o no.
- Hasta hace poco tiempo las muestras procedentes de delitos sexuales eran de difícil manejo pues se encuentran frecuentemente contaminadas con material genético propio de la víctima, sin embargo en la actualidad el desarrollo de técnicas de extracción diferencial, ha permitido en la mayoría de los casos, superar este problema.
- El uso de RFLPs en investigación y medicina, sigue y seguirá todavía por algún tiempo debido a su utilidad y precio, sin embargo en el área forense, los resultados que se obtienen con estas técnicas de tipificación no son los mas adecuados y desde hace algunos años han sido por completo sustituidos por los STRs, que involucran un numero mayor de marcadores y condiciones de muestra menos exigentes.

En honor a la verdad las herramientas con las que cuenta el químico para la realización de su trabajo, son en general adecuadas, pero existen aun condiciones que están fuera de su control, como es el estado de las muestras, el costo de los reactivos y equipos, y la disposición de nuevas tecnologías conforme el avance de la ciencia; queda por ejemplo pendiente el desarrollo de técnicas de separación de DNA procedente de violaciones donde intervienen dos o más individuos, de tal forma que podamos obtener sus “huellas genéticas” por separado, algo que hasta el momento no se realiza. Así que, como podemos observar, estamos aun al inicio de lo realizable.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Groleau GA, Jackson MC. Forensic Examination of victim and perpetrator of sexual assault. En: Olshaker SJ, Jackson MC, Smock WS, editores. Forensic Emergency Medicine. EUA: lippincott Williams & Wilkins, 2001: 85-103.
2. Burges, Holmstrom. Citado en: Vargas AE. Medicina legal. Ed. Trillas: México, 1998.
3. Vargas AE. Medicina legal. Ed. Trillas: México, 1998.
4. Gisbert CJ. Medicina Legal y Toxicología. 4° edición. Ed. Savat Editores: España, 1991.
5. Trujillo NG. Medicina Forense. Ed. Ciencia y Cultura Latinoamericana SA de CV: México, 1999.
6. Achaval A. Manual de Medicina Legal Practica Forense. 3° edición. Ed. Abeledo-Perrot: Argentina, 1988.
7. Lorente J, Lorente M. El ADN y la identificación criminal y en la paternidad biológica. Ed. Comares: España, 1995.
8. Stauton W. Bioquímica Medica. 4° edición. Ed. Interamericana: México, 1969.
9. Vick LR. Fisiología Medica Contemporánea. Ed. McGraw-Hill: México, 1987.
10. González F, Martínez M. Técnicas Instrumentales en Genética Forense. Ed. Institución Fernando el Católico: España, 2001.
11. Lundquist F. Methods of Forensic Science. Vol 1. Ed. Interscience Publishers: USA, 1962.
12. Martínez MS. Medicina Legal. 16° edición. Ed. Méndez Editores: México, 1991.

13. Knight B. **Medicina Forense de Simpson**. 2° edición. Ed. El Manual Moderno: México, 1999.
14. Ángel MG. **Interpretación Clínica del Laboratorio**. 5° edición. Ed. Medica Panamericana: Colombia. 1996.
15. Garther LP, Hiatt JL. **Atlas Color de Histología**. 3° edición. Ed. Médica Panamericana: Argentina, 2003.
16. Guyton AC. **Tratado de Fisiología Médica**. 10° edición. Ed. Interamericana SA de CV: México, 2001.
17. O'Rahilly R. **Anatomía de Gardner**. 5° edición. Ed. Interamericana McGraw – Hill: México, 1995.
18. Latarjet M, Ruiz AL. **Anatomía Humana**. 3° edición. Ed. Médica Panamericana SA: España, 1999.
19. Ganong WF. **Fisiología Médica**. 16° edición en español. Ed. El Manual Moderno SA de CV: México, 1998.
20. González AJ, Arilla FE, Rodríguez SS, Sánchez PA. **Bioquímica Clínica**. Ed. McGraw – Hill / Interamericana de España SAU: España 1998.
21. King SS. **Líquidos Corporales y Análisis de Orina**. Ed. El Manual Moderno: México, 1991.
22. Quiroz CA. **Medicina Forense**. 9° edición. Ed. Porrúa: México, 1999.
23. García AJ. **Lo que me contaron los muertos, recuerdos y experiencias de un medico forense**. Ed. Ediciones Temas de Hoy: España, 1994.
24. Martínez JM. **La prueba del ADN en Medicina Forense, la genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad**. Ed. Masson: España, 1999.
25. Basile AA, Waisman D. **Fundamentos de Medicina Legal**. Ed. El ateneo Pedro García SA: Argentina 1989.

26. Soria VM, Hernández SJ. El agresor sexual y la víctima. Ed. Boixareu Universitaria Macombo SA: España 1994.
27. Tello FJ. Medicina Forense. Ed. Melo SA: México 1991.
28. Olshaker JS, Jackson MC, Smock WS. Forensic Emergency Medicine. Ed. Lippincott Williams & Wilkins: USA, 2001.
29. Adelson L. The Pathology of Homicide, a Vademécum for pathologist, prosecutor and defense counser. Ed. Charles C. Thomas Publisher: USA, 1974.
30. Sanz DJ. Avances en Medicina Legal: Ingeniería Genética, Alteraciones psíquicas y Drogas. Ed. José Maria Bosch: España 1999.
31. Alva RM. Compendio de Medicina Forense. Ed. Méndez Cervantes: México 1991.
32. Cavalcanti GL. Estudos Médico Legais. 1º edición. Ed. Zagra -DC LUZZATTO- : Brasil, 1996.
33. Agenda Penal Federal y del D.F. 2003. Ed. Raúl Juárez Carro SA.: México, 2003.
34. Código Penal Federal. Ed. Raúl Juárez Carro SA.: México, 2003.
35. Nuevo Código Penal para el Distrito Federal con sus reformas y adiciones, publicadas el 15 de Mayo de 2003 en el GODF. Ed. Raúl Juárez Carro SA.: México, 2003.
36. Nueva Ley de atención y apoyo a las víctimas del delito para el Distrito Federal. Ed. Raúl Juárez Carro SA.: México, 2003.
37. Franco de AM. Hematología Forense y otras Técnicas Serológicas. 4º edición. Ed. Porrúa. México, 2002.
38. Raffo OH. La Muerte Violenta. Ed. Universidad: Argentina, 1997.

39. Kaplan LA, Presce AJ. Química Clínica, técnicas de Laboratorio, Fisiopatología, Métodos de análisis. Ed. Médica Panamericana: Argentina, 1990.
40. Ángel MG. Interpretación Clínica del Laboratorio. 5° edición. Ed. Médica Panamericana: Colombia 1996.
41. Henry RJ. Química Clínica, principios y técnicas. 2° edición. Ed. JIMS: España, 1980.
42. Solís CB. Técnicas de Tinción para Espermatozoides. Reporte de Servicio Social. Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza. 1998.
43. OMS Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Ed. Panamericana: Argentina 1987.
44. Gonzáles AF, Martínez JM. Técnicas Instrumentales en Genética Forense. Ed. Institución Fernando el Católico: España, 2001.
45. Q. Gabriela Chávez Marín. Jefe de Laboratorio de Genética PGR del Edo. de Méx.
46. Evett WI, Weir SB. Interpreting ADN Evidence Statistical Genetics for Forensic Scientists. Ed. Sinaver Associates Inc.: USA, 1998.
47. Alcocer PJ, Alva RM. Medicina Legal, conceptos básicos. Ed. Limusa SA de CV: México, 1993.
48. Putz R, Pabst R. Atlas de Anatomía Humana Sobotta. 22° edición. Ed. Médica Panamericana: España 2002.
49. DeLeón RI, Martínez GL. Introducción a la Citología Ginecológica. IPN, ENCB. México, 1995.
50. Caro CD. Imputación objetiva, delitos sexuales y reforma penal. Instituto de Investigaciones Jurídicas UNAM. México, 2002.

51. Azarcon DP. Interrogatorio ofensivo. *Philippine Journalism Review*, enero-marzo 1999. Las filipinas.
52. Vollenhoven S. Tarea especial: tema, La violación. *South African Broadcasting Corporation-TV*. Sudáfrica, 8 Junio 1999.
53. Bitangaro B. La violación, el cancer del que no se habla entre las mujeres refugiadas. "Women's vision" *The New Vision*. Uganda, 13 Julio 1999.
54. Violencia contra la mujer. La violencia en las américas , la pandemia social del siglo XX. Organización Panamericana de la Salud. OMS. Comunicado para la salud n° 10, 1996.
55. Mathu EN. Incesto – cuando el silencio no tiene sentido. *Parents*. Kenia Septiembre 1999.
56. De la Torre G. Responsabilitá dei medici per violazione degli obblighi di servizio. *L'amministrazione Italiana*. Italia, Octubre n° 10, 2001.
57. Warner K. Sentencing in cases of marital rape towards changing the maleimagination. *Legal Studies*. *The Journal of the Society of Public Teachers of Law*. Vol 20, n° 4, Noviembre 2000, Gran Bretaña.
58. Saran S. La violación ¿Estas en peligro?. *Femina*. India, 15 Abril 1999.
59. Akrofi-Quarcoo S. Los gobiernos y la violencia en contra de las mujeres. *Ghana Radio News*. Ghana Broadcasting Corporation y *Daily Graphic*. Ghana, 13 Junio 1999.
60. Saran S. Definición legal de la violación. *Femina*. India, 15 Abril 1999.
61. Ciuro CM. Comprensión trialista del sentido comunitario del genoma humano. *Bioetica y Bioderecho*. Fundación para los investigaciones Jurídicas Universidad Nacional de Rosario. Argentina, N° 6, 2001.