

Identificación del cromosoma “Y” por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras citológicas de mucosa vaginal poscoito

Mayor M.C. Ana Adriana **Guerrero-Terrazas**,*

Mayor M.C. Gabriela **Mendoza-Díaz**,** Mayor M.C. Juan Rubén **Hernández-Chávez*****

Laboratorio Multidisciplinario de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad/Hospital Central Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. La positividad de estudios de laboratorio y exámenes médicos practicados tanto a la víctima como del victimario dentro del procedimiento de integración de una averiguación previa por el delito de violación, se encuentran influenciados por un sinnúmero de factores. Es, sobre todo, en los casos donde no se cuenta con la presencia del presunto agresor, donde se requiere de una prueba rápida y específica que permita determinar si hubo cópula en una presunta víctima del delito de violación.

Objetivo. Proponer un estudio sensible, rápido y de bajo costo que sirva como prueba pericial para demostrar el antecedente de cópula, en casos de violación.

Material y métodos. Para este estudio se contó con mujeres voluntarias, con vida sexual activa. Se tomaron 60 muestras de ADN y se organizaron en tres grupos.

Resultados. Éstos indicaron que es posible identificar secuencias de cromosoma Y por medio de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en muestras citológicas de mucosa vaginal poscoito, hasta 15 días posterior a la cópula en los casos de eyaculación intravaginal.

Discusión. Se determinó que con este estudio es posible demostrar la presencia de secuencias del cromosoma Y en muestras poscoitales de mucosa vaginal por medio de la técnica PCR.

Palabras clave: Violación, cópula, reacción en cadena de la polimerasa, cromosoma.

Chromosome Y identification by polimerase chain reaction in postcoital cytological vaginal mucosa samples

SUMMARY

Introduction. The positivity of laboratory studies and medical examinations practiced as much the victim as the murderer within the procedure of integration of a previous violation crime inquiry, are influenced by an endless number of factors. It is, mainly, in the cases where it is not counted with the presence of the presumed aggressor, where it is required of a fast and specific test that allows to determine if there were coupling with the presumed victim of the violation crime.

Objective. To propose a sensible, fast study and of low cost that serves like expert test to demonstrate coupling antecedent, in cases of violation.

Material and methods. For this study voluntary women with active sexual life were studied. 60 DNA samples were taken and they were organized in three groups.

Results. These indicated that it is possible to identify sequences of chromosome Y and by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique in cytological samples of vaginal mucosa poscoito, up to 15 days later to coupling in the cases of intravaginal ejaculation.

Discussion. It was determined that with this study it is possible to demonstrate the presence of sequences of the chromosome Y in postcoital samples of vaginal mucosa by means of PCR technique.

Key words: Violation, coupling, polimerase chain reaction, chromosome.

* Maestro en Medicina Forense, ** Especialista en Anatomía Patológica, *** Jefe de la Sección de Posmortem del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Central Militar

Correspondencia:

Dra. Ana Adriana Guerrero-Terrazas

Calle Venustiano Carranza No. 3, Colonia Lázaro Cárdenas, Naucalpan, Estado de México

Recibido: Febrero 6, 2006.

Aceptado: Marzo 14, 2006.

Introducción

La violación

El delito de violación está tipificado por el Código Penal del Distrito Federal como grave, y se define como: “Al que por medio de la violencia física o moral realice cópula con persona de cualquier sexo.¹ Para comprobar el delito de violación se deben justificar los elementos que constituyen este hecho delictivo. El primer elemento material “la consumación de la cópula” se prueba con certificados médicos (ginecológico, proctológico), estudios de laboratorio (seminológico, grupo sanguíneo) y dictámenes periciales (estudio de pelos y fibras); el segundo elemento que es el empleo de la fuerza física o moral se prueba con los certificados de integridad física y lesiones y con el certificado psicológico; y finalmente la existencia o ausencia de voluntad por parte de la víctima con el examen psicofísico.²

Sin embargo, el resultado de dichos exámenes y estudios se ve influenciado por múltiples factores, tales como:

1. Tiempo que tarde la víctima en acudir a presentar la denuncia.
2. Uso de drogas para perpetrar una violación sin violencia física.
3. Aseo que se haya practicado la víctima posterior a la violación.
4. Uso o no de condón por el violador.
5. Eyaculación dentro o fuera de la vagina de la víctima.
6. Pericia del médico examinador, etcétera.

Utilización del ADN en medicina forense

Hace pocos años en Medicina Forense los análisis estaban basados en marcadores genéticos convencionales tales como antígenos eritrocitarios y leucocitarios, proteínas séricas y enzimas. En la década de 1980 se presentó un avance científico en el campo de la genética forense a raíz del descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN.³

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de aplicación *in vitro*, que se basa en la naturaleza que tiene el ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse. La reacción se lleva a cabo en un termociclador (aparato que genera ciclos térmicos) que se maneja automáticamente a tres temperaturas.

1. 93-95 grados centígrados para desnaturalizar el ADN.
2. 50-65 grados centígrados para el acoplamiento de los iniciadores.
3. 72 grados centígrados para que la polimerasa copie la cadena de ADN.

La importancia de este procedimiento radica en su capacidad para amplificar ADN impuro, fragmentado o intacto, por medio de reacciones químicas sencillas y la amplificación de secuencias conocidas. De este modo es posible amplificar secuencias específicas de ADN, desde cadenas tan cortas como

50 pares de bases, hasta cadenas con una longitud de más de 2,000 pares de bases; este procedimiento puede ser completado en pocas horas, siendo además de bajo costo.³

Métodos

Voluntarios

Para la realización del presente estudio se contó con mujeres voluntarias, con vida sexual activa, quienes cumplieron con los criterios de inclusión. La toma de muestras se realizó con las voluntarias en posición ginecológica, sin uso de espejo vaginal ni lubricantes, se realizó un raspado de las paredes vaginales con citobrush estéril, los cuales se conservaron y transportaron en tubos de eppendorf de 1.5 mL conteniendo buffer de extracción para ADN. Se tomaron en total 60 muestras, que se organizaron de la siguiente manera:

1. **Grupo 1.** Formado por las muestras citológicas de mucosa vaginal tomadas a cinco voluntarias; a cada una de ellas se les tomó una muestra control y tres muestras poscoito, una a las 24 horas, una a los siete días y otra a los 14 días poscoito, con el antecedente de eyaculación intravaginal.
2. **Grupo 2.** Formado de igual forma que el grupo uno con la diferencia de que la cópula se realizó sin eyaculación intravaginal.
3. **Grupo 3.** Igualmente formado que los anteriores, con el antecedente de cópula con uso de preservativo.

Extracción y purificación del ADN

Se realizó utilizando la técnica descrita por Sambrook y col., en 1994, como a continuación se describe:

1. Las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm por cinco minutos.
2. Mezclar por inversión y adicionar proteinasa K (concentración final de 20 µg/mL).
3. Mezclar por inversión e incubar a baño maría a 65 °C por 20 minutos.
4. Adicionar un volumen de fenol ultrapuro, agitar por inversión cinco minutos y centrifugar a 2,000 rpm durante cinco minutos. Recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo y repetir de nuevo el lavado.
5. Recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo y adicionar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (JTBaker) (24:2), agitar por inversión durante cinco minutos y centrifugar durante cinco minutos a 2,000 rpm. Recuperar la fase acuosa y lavar nuevamente.
6. Recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo y precipitar el ADN con cloruro de sodio una concentración final 0.2 M más un volumen de isopropanol.
7. Mezclar por inversión y centrifugar a 14,000 rpm durante tres minutos.
8. Extraer la fase acuosa y adicionar cinco volúmenes de alcohol etílico a 70%, mezclar por inversión y centrifugar.

gar a 14,000 rpm durante tres minutos. Extraer la fase acuosa y repetir el paso dos veces más.

9. Extraer la fase acuosa y colocar el tubo con el ADN en la estufa de cultivo a 37 °C durante, por lo menos, 15 minutos. Posteriormente resuspender el ADN en 20-40 μ L de agua libre de nucleasas.

Técnica de PCR

En tubo de eppendorf de 50 μ L lograr un volumen final de 12.5 μ L; se adiciona 1.2 μ L de buffer para pcr a 10x, 1.2 μ L de dNTP a 200 μ M, 10 μ L de oligonucleótidos 3'-5' y 10 μ L de oligonucleótidos 5'-3' (de cromosoma X o Y) a una concentración inicial de 10 μ M, 0.24 μ L de cloruro de magnesio a una concentración inicial de 50 mM, 0.2 μ L de Taq polimerasa concentrada a 5 U/ μ L, 1.5 μ L de ADN y completar con agua libre de nucleasas. Posteriormente se procesó en un termociclador (Perkin Ellis 9600) con el siguiente método: desnaturalizar a 94 °C por 2:30 minutos; tres ciclos de XX °C por dos minutos, 60 °C por dos minutos, 72 °C por dos minutos; 25 ciclos de 94 °C por un minuto, 60 °C por un minuto; 72 °C por un minuto; extensión a 72 °C durante cinco minutos y conservar a 4 °C por tiempo indefinido.

Los oligonucleótidos utilizados tienen las siguientes secuencias:

Y3: 5'-GTGTATTCACCTCCGGGAG, Y4: 5'-ACA-AAAGGTTCAATTCTGTGAG, X3: 5'-TATTTGGACTC-TCTCTGAGGA, X4: 5'-TTCTACTACAAGGGTGTTC.

Todos los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa a 3%, teñidos con 1.2 μ L de bromuro de etidio, posteriormente se visualizaron en un transiluminador de luz UV. Se buscaron bandas de 200 pb para cromosoma Y y de 157 pb para cromosoma X.

Método estadístico

El tipo de estudio es observacional y descriptivo.

Resultados

Se analizaron en total 60 muestras citológicas obtenidas de 15 voluntarias, cuatro muestras por cada mujer, una muestra control y tres poscoito (24 horas, siete días y 14 días), pertenecientes a tres grupos de estudio.

Todas las muestras tomadas a los tres grupos resultaron positivas para cromosoma X.

Todas las muestras control de los grupos 1 y 2, así como cuatro muestras del grupo 3 resultaron negativas para cromosoma Y; una de las muestras del grupo 3 resultó positiva para cromosoma Y.

Todas las muestras de los grupos 1 y 2, y una muestra del grupo 3 tomadas a las 24 horas poscoito resultaron positivas para cromosoma Y.

Todas las muestras del grupo 1 y cuatro del grupo 2 tomadas a los siete días poscoito resultaron positivas para cromosoma Y.

Tres de las muestras del grupo 1 tomadas a los 14 días poscoito resultaron positivas para Y.

Con respecto al grupo 3, a excepción de la muestra control y la de 24 horas poscoito positivas a Y, el resto resultaron negativas para dicho cromosoma.

Discusión

El presente estudio demostró que es posible identificar la presencia de secuencias del cromosoma Y en muestras poscoitales de mucosa vaginal por medio de la técnica de PCR, siempre y cuando la relación sexual se haya llevado a cabo sin condón.

El tiempo en que es posible detectar estas secuencias varía en relación con el antecedente de cópula acompañada o no de eyaculación intravaginal. Durante el estudio observamos que cuando la cópula se acompañó de eyaculación intravaginal, las secuencias de cromosoma Y fueron detectadas hasta el 14o. día poscoito en 60% de los casos; mientras que cuando no hubo eyaculación intravaginal, las secuencias mencionadas se encontraron sólo hasta el séptimo día poscoito en 80% de los casos, y en ninguna muestra correspondiente al 14o. día poscoito. Estas variaciones podrían atribuirse a la cantidad de células masculinas depositadas en la vagina durante la cópula, siendo obviamente mayor el número cuando existen miles o millones de espermatozoides portadores de cromosoma Y.

Por otro lado, se puede observar en el presente estudio, que una abstinencia sexual de 21 días es suficiente para obtener resultados negativos para cromosoma Y; ya que en el único control positivo (parte del grupo 3) sólo se guardó abstinencia sexual durante dos semanas, dato que se obtuvo después de obtener los resultados.

Referencias

1. Código Penal para el Distrito Federal. 12a Ed. México: Editorial Sista; 2004.
2. Seminario Federal de la Legislación. 5a Época. Tomo XCV. 2004, p. 357-8.
3. Desforges JF. The polymerase chain reaction. N E Tour Med 1990; 322: 178-81.
4. García ME. La utilización de la prueba de ácido desoxirribonucleico (ADN) para la aplicación de la Justicia en México. México: 2004.