

Pruebas forenses moleculares: del ADN a la identidad de la persona

Miguel Contreras-Pérez y Gustavo Santoyo-Pizano

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH. Morelia, Michoacán, México.
Contacto:miguel82cp@gmail.com

Resumen: El ADN (ácido desoxirribonucleico) se encuentra en cada una de nuestras células y su estudio nos permite conocer la identidad de la persona a la que pertenece el mismo, esto mediante el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), que no es más que la amplificación de fragmentos específicos de ADN. En las pruebas forenses moleculares se amplifican fragmentos de tamaño pequeño repetidos en tándem conocidos como STR (Short Tandem Repeats), así como polimorfismos del cromosoma Y o del ADN mitocondrial y el marcador de sexo de la amelogenina, los cuales pasan rigurosos procesos de validación y estandarización para ser utilizados con fines legales; mediante el uso de estos marcadores se generan perfiles genéticos con los que se nutren bases de datos en las que se comparan las muestras de los vestigios biológicos encontrados en las escenas del crimen; la asignación de un perfil positivo mediante la comparación de estos marcadores moleculares es sumamente confiable, ya que el encontrar una persona con un perfil genético idéntico es de 7×10^{-18} , es decir, uno en cien mil billones, lo cual es prácticamente imposible, por lo que es de suma importancia el fortalecer las bases de datos de perfiles genéticos así como las colaboraciones internacionales para permitir una rápida y confiable identificación de los vestigios biológicos, con lo que se logrará la resolución de crímenes que sin el uso de estas técnicas sería imposible.

Palabras clave ADN, PCR, perfil genético.

Introducción

Los diversos organismos vivos, incluyendo los humanos, contenemos ADN o ácido desoxirribonucleico en cada una de nuestras células. El ADN, por lo tanto, contiene toda la información genética (también conocido como genoma) que nos identifica como individuos únicos; es decir, ahí encontramos una huella molecular que permite diferenciarnos con otras personas; esto, a pesar que nuestro genoma es 99.9% idéntico.

En la actualidad el uso de técnicas moleculares para la identificación de personas en las ciencias forenses permite una precisa identificación a través del análisis de nuestra huella molecular o ADN. A través de las pruebas forenses moleculares también se puede determinar la paternidad, el parentesco entre familiares o resolver algún crimen cometido donde involucre el análisis de muestras celulares que contengan ADN, incluyendo cabello, sangre, esperma, etcétera (Gehrig & Teyssier, 2002).

Para poner un poco de contexto, hasta antes de las pruebas forenses

moleculares, era muy complicado identificar a una persona a la que pertenecían los vestigios biológicos encontrados en algún lugar, debido a que estos se encontraban degradados o en proporciones muy pequeñas. Al profundizar en el estudio del ADN, se crearon técnicas para amplificarlo y de pequeñas muestras se logró obtener una mayor cantidad de material para analizar, logrando así desarrollar una técnica que sea útil para la identificación de personas (Schneider, 2007). Como se había comentado anteriormente, las secuencias de nuestro ADN son muy similares, por lo que es necesario identificar regiones con diferencias específicas que permitan reconocer pequeñas variaciones. En ocasiones se puede analizar desde una sola célula y obtener el material genético completo, o al menos, identificar ciertos marcadores o genes que permitan su análisis. Una de las técnicas utilizadas para la amplificación del ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR, Polymerase Chain Reaction) (Erlich *et al.*, 1991), que es la técnica en la que, mediante el uso de pequeñas secuencias de nucleótidos llamadas primers, se obtienen millones de copias de una región específica del ADN, logrando

con esto aislar diversas regiones del ADN para su análisis e identificación. Existen diversos artículos sobre el tema de la PCR, por lo que se recomienda su lectura para profundizar en el tema (ver Rodríguez Sánchez y Barrera Saldaña, 2004).

¿Qué regiones del ADN se amplifican para la identificación forense?

En el ADN existen regiones que son utilizadas para la síntesis de proteínas conocidas como genes (ADN codificante) y debido a que tienen una función esencial en el organismo, por lo general son genes de secuencia poco variables. Por otra parte, las regiones que no son utilizadas para la síntesis de proteínas (ADN no codificante) son segmentos de secuencias altamente variables, por lo que se pueden encontrar diversos tipos de mutaciones, también conocidas como polimorfismos. Los polimorfismos de secuencia (cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN que se conocen como SNP's por sus siglas en inglés) y los polimorfismos de longitud (producidos por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos, los cuales forman el ADN repetitivo en tándem o VNRT por sus siglas en inglés). Es precisamente en este ADN en el que se enfocan las pruebas de genética forense. Los polimorfismos de longitud también se pueden dividir en ADN satélite (de 50 a 500 pares de bases [pb]), ADN minisatélite (7 a 49 pb) y ADN microsatélite (2 a 6 pb), siendo los más usados el ADN minisatélite y el ADN microsatélite (Schlötter, 2000).

Como ya se mencionó, el 99.9% del ADN es similar entre todas las personas, para solucionar este problema, la identificación forense se basa en el uso de las secuencias cortas repetidas en tándem (STR's por sus siglas en inglés), debido a que estas se forman por herencia del padre y de la madre y son diferentes entre la población, excepto en el caso de los gemelos que comparten saco vitelino (Jobling & Gill, 2004).

Las secuencias STR's deben de pasar varios filtros antes de su uso para la identificación de personas, ya que

Milenaria, Ciencia y Arte 9

previamente deben ser estandarizados y pasar arduas pruebas de repetitividad y reproducibilidad (Moretti *et al.*, 2001). Se utilizan 15 STR's de 4 a 5 pb en la unidad de repetición y no pasan de las 200 pb en su secuencia total, ya que esto les brinda mayor estabilidad tanto a la degradación como a los artefactos. Los 15 STR's utilizados actualmente (ya que son los que hasta el momento se encuentran validados y autorizados) son D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 y FGA (Ruitberg *et al.*, 2001).

STR's ¿La única opción para el análisis de los vestigios biológicos?

Adicional al uso de estos 15 STR's de ADN nuclear, también se usan polimorfismos SNP's de ADN mitocondrial y del cromosoma Y (alosome o cromosoma sexual), así como el marcador de sexo de la amelogenina (Dos Santos-Rocha *et al.*, 2018). El ADN mitocondrial sirve principalmente para buscar polimorfismos en muestras degradadas, debido a que es más estable y por lo tanto se conserva íntegro durante más tiempo que el ADN nuclear, principalmente se usa para la identificación de personas a partir de restos óseos. Los polimorfismos del cromosoma Y se utilizan principalmente en estudios de paternidad, ya que este se hereda de padre a hijo, y los cambios que pueda tener solo son derivados de mutaciones, aunque también se emplea ampliamente cuando se tienen muestras mezcladas de material genético masculino y femenino. El gen de la amelogenina es usado para determinar el sexo de la persona de la cual provienen los vestigios biológicos. Esto es debido a que este gen se puede encontrar en el cromosoma X (AMELX) obteniendo un amplificado de 106 pb, o también puede estar presente en el cromosoma Y (AMELY) obteniendo un amplificado de 112 pb. Por lo tanto, al realizar electroforesis de una muestra de origen masculino (XY) se observen dos bandas y en las muestras de origen femenino (XX) solo se observe una banda,

permitiendo así discernir el sexo de la persona a partir de una muestra de ADN (Velarde-Félix *et al.*, 2008).

Análisis genético forense

La cantidad e integridad del ADN que se obtiene de los vestigios biológicos recuperados era una limitante mayor a considerar en los años 80's y 90's, ya que al tener que realizar una amplificación y una secuenciación por cada STR a analizar, exigía una gran cantidad de muestra íntegra, y por lo tanto, un costo muy elevado (Urquhart *et al.*, 1994). En la actualidad existen secuenciadores automáticos y PCR multiplex, que son aquellos aparatos que realizan amplificaciones simultáneas de los diferentes STR's a partir de una sola muestra mediante el uso de primers (secuencias cortas de nucleótidos), marcados con fluoróforos (componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente), lo que permite obtener perfiles genéticos con muestras escasas, disminuyendo costos y tiempo de análisis, pudiendo rápidamente comparar los perfiles genéticos (STR's amplificados) de las muestras obtenidas en algún caso de estudio. Los equipos más usados son aquellos que amplifican 9 STR's más el marcador de sexo de la amelogenina y los que amplifican 15 STR's más el marcador del sexo de la amelogenina (Butler, 2015¹); el proceso general para realizar los análisis genéticos forenses se puede observar en la **Figura 1**.

Al realizar el perfil genético de 15 STR's (de los vestigios biológicos y/o de los presuntos culpables) se incrementa notablemente la capacidad de identificar

la correspondencia a los perfiles genéticos comparados, esto de manera sumamente confiable, ya que la posibilidad de encontrar al azar a una persona con 15 STR's idénticos al de otra persona es de 7×10^{-18} , es decir, uno en cien mil billones, lo cual es prácticamente imposible; ahí radica la importancia de crear bases de datos con perfiles genéticos, para así tener con que comparar los perfiles obtenidos de los vestigios biológicos de las escenas del crimen (Butler, 2015²).

Actualmente, en los Estados Unidos de América se realizan bases de datos de todos los reos, para que adicional a tener una base de datos con sus huellas digitales, también tener una base de datos con su huella digital genética, es decir su perfil genético, las cuales se guardan en el Combined DNA Index System (CODIS por sus siglas en inglés) (Baechtel *et al.*, 1991). Existen también bases de datos europeas, siendo la más conocida la United Kingdom National DNA Database (NDNAD por sus siglas en inglés) ya que fue la primer base de datos forense mundial creada en 1995 (Schneider & Martin, 2001), teniendo estas una gran cantidad de perfiles genéticos (**Figura 2**) y existiendo esfuerzos para homologar el contenido de estas bases de datos y lograr así tener una base de datos mundial, lo que conlleva a desarrollar estrategias para el manejo y conservación de esta información (Wallace *et al.*, 2014)

Para que el perfil genético de algún vestigio obtenido de una escena de un crimen, prueba de paternidad o identificación de una persona

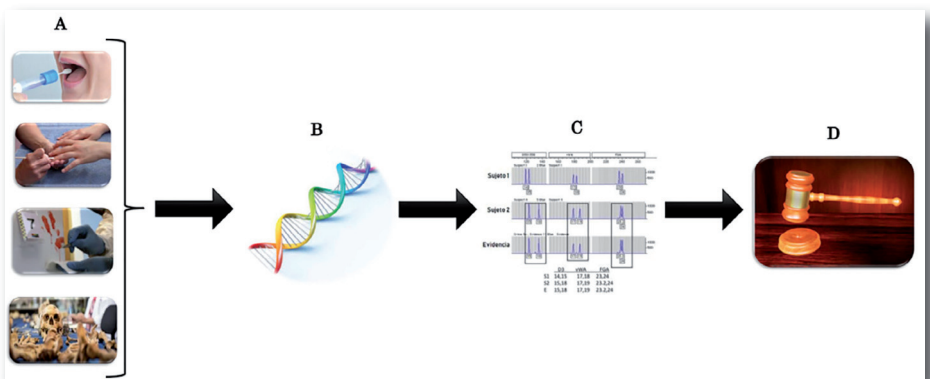


Figura 1. Análisis molecular de vestigios en medicina forense; A.- Toma de muestra de vestigios a analizar (saliva, células epiteliales, sangre, etcétera); B.- Extracción de ADN; C.- Amplificación y comparación de STR's de las bases de datos o sospechosos en el caso; D.- Dictamen de la procedencia de los vestigios.

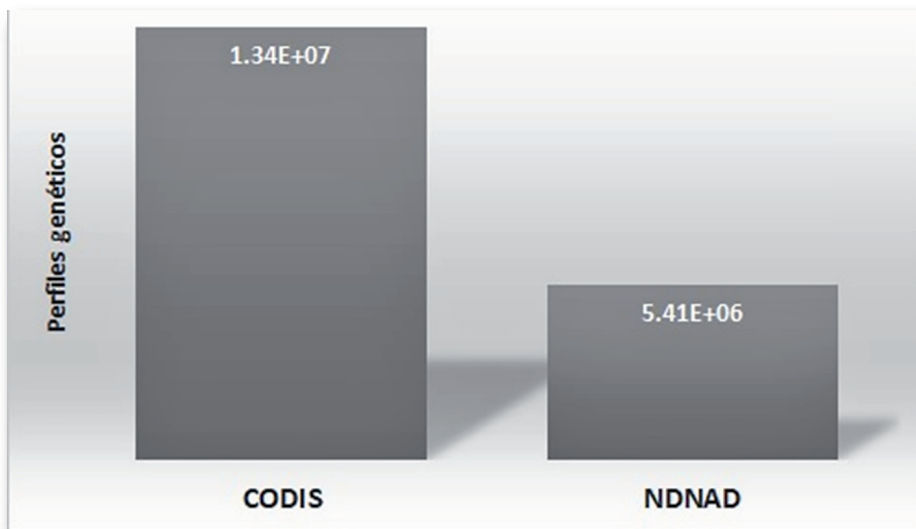


Figura 2. Perfiles genéticos en las bases de datos CODIS y NDNAD (Datos obtenidos de las páginas oficiales <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis/ndis-statistics> y <https://www.gov.uk/government/statistics/national-dna-database-statistics> a Junio de 2018)

desaparecida tenga una aplicación legal, se debe tener especial cuidado en la toma de las muestras y la cadena de custodia de las mismas, todo ello para evitar la contaminación de las mismas (Lee *et al.*, 2013). Una vez en el laboratorio, se debe analizar el máximo de polimorfismos disponibles para obtener un perfil genético completo y comparar los resultados obtenidos con los de él o los sospechosos y finalmente elaborar el informe médico-legal que puede ser utilizado para deslindar responsabilidades en un juicio (Guillén *et al.*, 2000). En la actualidad diversos laboratorios ofrecen este tipo de pruebas, sin embargo, los costos aún siguen siendo relativamente altos, lo que restringe el acceso a estas metodologías para los países subdesarrollados y en menor medida a los países en vías de desarrollo, existiendo también la escasez de personal calificado en las dependencias gubernamentales e instituciones privadas, por lo que en esta área existe un gran número de oportunidades de desarrollo.

Conclusiones y perspectivas

En la actualidad las técnicas moleculares en diversos campos, incluida la medicina forense, ha tenido grandes avances en cuanto a la rapidez y precisión con la que se pueden analizar las muestras, ya que como se mencionó, las pruebas forenses moleculares comenzaron analizando 1 STR a la vez y ahora se analizan 15 STR's o más de manera simultánea,

dando mayor fidelidad y confiabilidad de los resultados obtenidos. Sin duda que, en pocos años, las pruebas moleculares forenses no sólo incluirán estos marcadores genéticos, sino que se tendrá la validación de otros marcadores en el genoma. Además, se contará con equipos que analizaran dichas muestras de manera conjunta, utilizando menores cantidades de ADN, así como muestras degradadas, incompletas o mezclas de diferentes personas. Debido a que estas técnicas se encuentran cada vez más al alcance de Universidades y Centros de Investigación en el país, se realizarán aportes importantes a la validación y ampliación de las mismas, logrando tal vez de esta forma, homologar las bases de datos internacionales y tener así una única base de datos de perfiles genéticos globales. Lo anterior es indispensable en un país como México, donde no existe o es limitada la información sobre muestras forenses analizadas en los Estados de la República. Además, de que no existen protocolos de información que estandaricen la información en una sola base de datos para todo el país. Lo anterior ayudaría a determinar de una forma más rápida o eficiente la identificación de personas desaparecidas o el esclarecimiento de crímenes.

Referencias

Baechtel F.S., Monson K.L., Forsen G.E., Budowle B., Kearney J.J. (1991) Tracking the

Violent Criminal Offender through DNA Typing Profiles — a National Database System Concept. En: Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R. (Eds.) *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications. Experientia Supplementum* (Vol. 58:356-360). Basel, Switzerland: Birkhäuser

Butler, J.M.¹ (2015). Data, Models, Thresholds. En: J.M. Butler (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. (3ª Edición, Vol. 3:25-46). Gaithersburg, Maryland, USA: Academic Press

Butler, J.M.² (2015). STR Profiles: Multiplex PCR, Tri-Alleles, Amelogenin, and Partial Profiles. En: J.M. Butler (Ed.), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. (3ª Edición, Vol. 3:109-127). Gaithersburg, Maryland, USA: Academic Press

Dos Santos-Rocha, A., Salviano-Soares de Amorim, I., De Almeida-Simao, T., De Souza-Da Fonseca, A., Grazinoli-Garrido, R. & Luiz-Mencalha, A. (2018). High-Resolution Melting (HRM) of Hypervariable Mitochondrial DNA Regions for Forensic Science. *Journal of Forensic Sciences*, 63(2):536-540.

Erich, H.A., Gelfand, D. & Sninsky, J.J. (1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252:1643-1651.

Gehrig, C. & Teyssier A. (2002). Forensic DNA Analysis. *Chimia*, 56(3):71-73.

Guillén, M., Lareu, M.V., Pestoni, C., Salas, A. & Carracedo, A. (2000). Ethical-legal problems of DNA databases in criminal investigation. *Journal of Medical Ethics*, 26:266-271.

Jobling, M.A. & Gill, P. (2004). Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. *Nature Reviews | Genetics*, 5:739-751.

Lee, S.B., Crouse, C.A. & Kline M.C. (2013). Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts. En: J.G., Shewale (Ed.), *Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies*. (1ª Edición, Vol. 1:19-37). Foster City, California, USA: CRC Press.

Moretti, T., Baumstark, A., Defenbaugh, D., Keys, K., Smerick, J. & Budowle, B. (2001). Validation of Short Tandem Repeats (STRs) for Forensic Usage: Performance Testing of Fluorescent Multiple STR Systems and Analysis of Authentic and Simulated Forensic Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46(3):647-660.

Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).

Ruitberg, C.M., Reeder, D.J. & Butler, J.M. (2001). STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research*, 29(1):320-322.

Schlöterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109:365-371.

Schneider, P.M. & Martin, P.D. (2001). Criminal DNA databases: the European situation. *Forensic Science International*, 119:232-238.

Schneider, P.M. (2007). Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International*, 165:238-243.

Urquhart, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J. and Gill, P. (1994). Variation in Short Tandem Repeat sequences — a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine*, 107:13-20.

Velarde-Félix, J.S., Molina-Benítez, C.E., Solórzano-Rosales, S.R., Cázarez-Salazar, S.G., Rendón-Aguilar, H., Murillo-Llanes, J. & Ríos-Tostado, J.J. (2008). Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 55(1):17-20.

Wallace, H.M., Jackson, A.R., Gruber, J. & Thibedeau, A.D. (2014). Forensic DNA databases-Ethical and legal Standards: A global review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 4:57-63.