

# Identificación Molecular de Individuos

LAQB. Daniel Cervantes García <sup>1</sup>  
 LAQB. Silvia Lorena Mendoza Delgado <sup>2</sup>  
 LAQB. Teresa Cecilia Pérez Aguirre <sup>2</sup>  
 Dr. en C. Netzahualcóyotl Mayek Pérez <sup>2</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los avances científicos han permitido la resolución de problemas de forma precisa y que antes eran resueltos por la subjetividad personal. La Biología Molecular se ha proyectado más allá de los laboratorios de investigación científica y, gracias a ella, se logra la identificación de individuos en las áreas Forense y Legal, eliminando toda subjetividad y apoyándose en técnicas novedosas. La información contenida en todas y cada una de las células del organismo humano, excepto los glóbulos rojos, está agrupada en un juego de cromosomas (46 en total), de los cuales el 50 % son donados por la madre y 50 % por el padre. Cada una de las posibilidades de un gen (paterno y materno) se conoce como alelo. Los cromosomas representan al ácido desoxirribonucleico (DNA) en una configuración altamente compactada. El DNA es la molécula lineal de doble cadena que permite a un ser vivo desarrollarse. La molécula está compuesta por un código de cuatro letras que corresponden a cuatro bases nitrogenadas (A, adenina; T, timina; G, guanina y C, citosina) y que también está presente, aunque con un orden diferente, en todo ser vivo. La secuencia de bases nitrogenadas del DNA es el molde para la síntesis de un mensajero (RNA, ácido ribonucleico) que será traducido en

una proteína con una función específica (en la mayoría de los casos). Se conoce como genoma a toda la secuencias de bases nitrogenadas escritas por estas cuatro letras.

La culminación del Proyecto Genoma Humano ha permitido determinar la proporción del genoma que expresa un RNA y luego una proteína (aproximadamente 25 %); y este DNA es informativo. El resto del genoma (75 %) corresponde a secuencias intergénicas no informativas. Dentro de estas secuencias se encuentran los llamados DNA satélites, grupos repetidos de secuencias de nucleótidos. Por otra parte, existen también secuencias repetidas con menor tamaño al DNA satélite, denominadas regiones minisatélites, que corresponden a secuencias de 10 a 15 pares de bases (pb) altamente repetitivas y que forman fragmentos de alrededor de 30 kb (Repetidos en Grupos de Número Variable o VNTR's). Finalmente, existen microsatélites con secuencias de dos a siete nucleótidos repetidos en fragmentos de <1 kb (Repetidos en Grupos Cortos o STR's). Ambas regiones cambian entre individuos de la misma especie y son hipervariables (5, 10, 11, 15). La determinación de la huella genética, es decir, la variabilidad genética determinada por las VNTR's o STR's que diferencian de un individuo a otro, corresponde a procedimientos que permiten reconocer a un individuo único y sin riesgo de error mediante las regiones hipervariables en él caracterizadas. Cada ser humano, excepto los gemelos idénticos, difiere en millones de lugares de su secuencia de DNA en comparación con otra persona. Las huellas genéticas descritas por Jeffreys (7, 8) permiten la identificación de

<sup>1</sup> Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, C.P. 20100, Aguascalientes, México. Fax (499) 9108401. E mail: dcervantes@hotmail.com

<sup>2</sup> Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, Blvd. del Maestro esq. Elías Piña s/n, Col. Narciso Mendoza, 88710, Reynosa, Tamaulipas, México, Fax (899) 9243627.

individuos gracias a la variabilidad de su DNA, lo que tiene impacto en Medicina Legal y Forense, particularmente en problemas de crímenes, violaciones o paternidad, todo ello con un margen de error prácticamente nulo (7, 8, 17).<sup>3</sup>

### TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS

#### Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP's)

Esta técnica utiliza enzimas de restricción que cortan el DNA en regiones hipervariables (3). La técnica consiste en el aislamiento del DNA

de la muestra que será analizada y de su corte en pequeños fragmentos mediante enzimas de restricción; la separación de los fragmentos por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida; la transferencia del DNA a una membrana de nylon ("Southern blot"); la hibridación con una sonda de DNA y; la visualización de la sonda de hibridación y, por tanto, la determinación del perfil de DNA de la muestra. En esta técnica, la sonda de hibridación está radiactivamente marcada y, por exposición a una película de rayos X, revela la hibridación (Figura 1). La variación detectada se debe a la recombinación genética (intercambio de secuencias entre cromosomas homólogos) entre unidades de repetición.

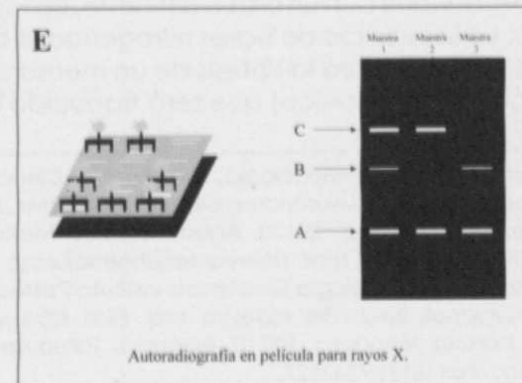
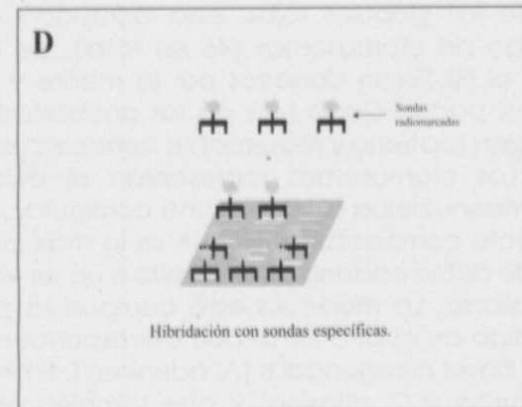
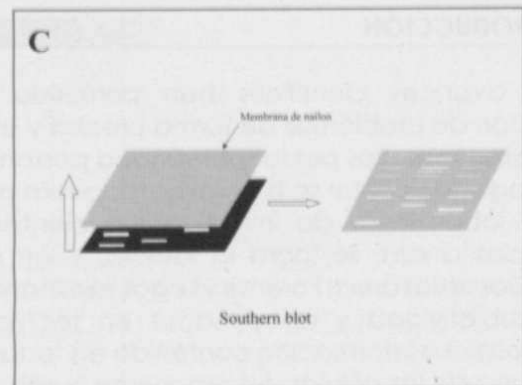
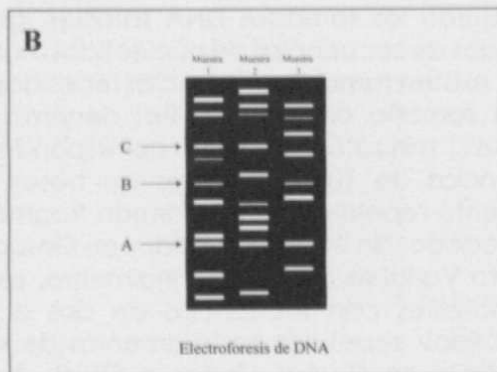
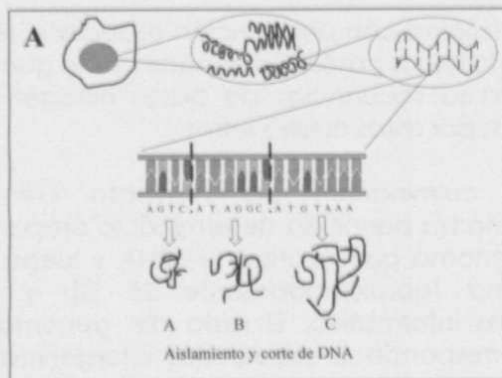


Figura 1. Procedimiento general para el análisis RFLP (12, 13).

<sup>3</sup> El análisis del DNA hipervariable se inició en abril de 1985 cuando fue resuelto el primer caso judicial por la aplicación de técnicas moleculares mediante la caracterización de secuencias hipervariables del DNA (7). Los resultados obtenidos mediante el estudio de las Huellas Genéticas (HG) o "DNA fingerprinting" permitieron aclarar una disputa por inmigración en Gran Bretaña (8). Poco tiempo después, una corte civil inglesa aceptó la evidencia del DNA en un caso de paternidad discutida. A partir de 1987, las pruebas de DNA fueron admitidas como evidencia en las Cortes Criminales de Gran Bretaña y Estados Unidos.

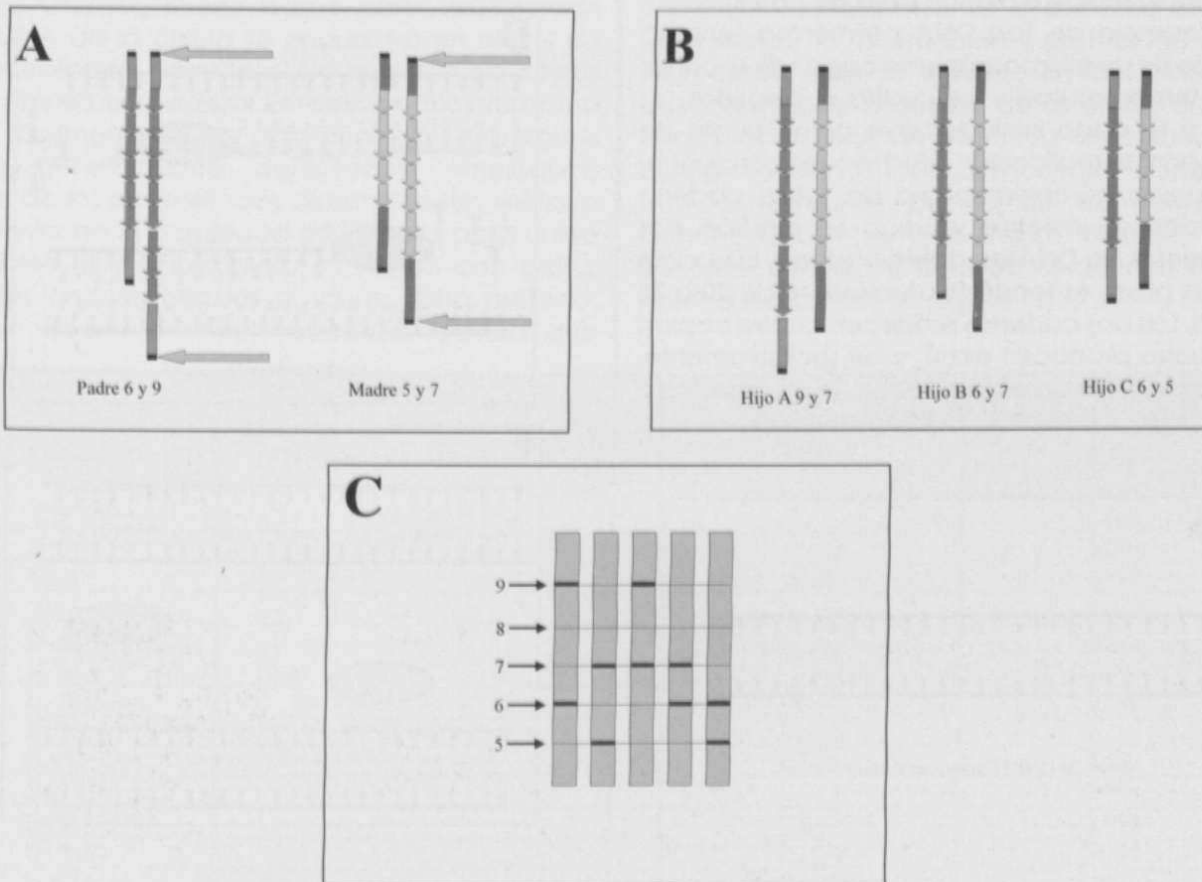
**Minisatélites o VNTR's**

Los VNTR's son regiones de DNA que incluyen miles de pares de bases. Una familia de VNTR's consta de una unidad de secuencia "central" común, que es rica en G-C de 10 a 15 pb. Si se tiene en consideración la situación mostrada en la Figura 2, donde cada uno de los padres muestra secuencias hipervariables, el padre presenta 6 unidades repetitivas de VNTR's en un alelo, y 9 en el otro; la madre presenta 5 y 7 VNTR's, por lo tanto, cada uno de sus hijos heredará uno de los alelos de los padres, teniendo dos posibilidades: puede suceder que el primer hijo (A) herede el

alelo que presenta 9 VNTR's del padre y el de 7 VNTR's de la madre, otro (B) heredaría el alelo de 6 VNTR's del padre y el de 7 VNTR's de la madre y, finalmente, otro (C) presentará el alelo de 6 VNTR's del padre y el de 5 VNTR's de la madre (Figura 2B). Luego del rompimiento con enzimas de restricción (Cuadro 1) y de la separación de los fragmentos por electroforesis, se obtendrán diferencias en el bandeo debido a que se tienen fragmentos de DNA de tamaño diferente (Figura 2C). Ahora, podríamos imaginarnos este mismo número de alelos, pero multiplicado 1000 veces; entonces se cumple el principio de la técnica conocida como "DNA fingerprinting" (9, 10, 16).

| Laboratorio | Enzima        | Secuencia de DNA Reconocida                                 |
|-------------|---------------|---|
| Cellmark    | <i>HinfI</i>  | ---GANTC---1  |
| FBI         | <i>HaeIII</i> | ---CTNAG---   |
| Lifecodes   | <i>PstI</i>   | ---GGGCC---<br>---CCCGGG---<br>---CTGCAG---<br>---GACGTC--- |

**Cuadro 1.** Enzimas de restricción actualmente usadas para el análisis forense (13).



**Figura 2.** Determinación de un par de alelos de VNTR's en una familia (16).

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Muchos especímenes forenses pequeños, viejos o que han sido expuestos a condiciones ambientales extremas que dañan al DNA convierten al análisis RFLP en poco informativo. Para este tipo de muestras, cuando la cantidad y calidad de DNA es inadecuada para el análisis, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) puede superar estas dificultades y permitir el estudio de evidencias biológicas. La PCR es semejante a una fotocopia molecular ya que amplifica cientos de veces una misma secuencia específica de DNA. La PCR facilita las actividades forenses, pues permite al científico tomar una muestra de DNA que generalmente podría ser insuficiente para detectar sus características y amplificarla hasta alcanzar las copias que sean necesarias para otros análisis (13, 17). La PCR consiste en tres pasos: cada segmento de doble cadena es separado en dos cadenas sencillas por acción del calor; los segmentos de cadena sencilla se hibridan con iniciadores (pequeñas secuencias de DNA de 20 a 30 nucleótidos de longitud) que complementan y definen la secuencia molde o blanco para ser amplificada; en presencia de Taq DNA polimerasa (enzima aislada de un microorganismo capaz de soportar altas temperaturas) y los cuatro nucleótidos (A, C, G y T), cada iniciador sirve como punto de inicio para la replicación de la secuencia blanco. Una copia complementaria de cada cadena separada se sintetiza y luego se tendrán dos segmentos de DNA de doble cadena. Este ciclo de tres pasos es repetido usualmente de 20 a 35 veces. Las dos cadenas producen cuatro copias; las cuatro producen ocho, y así sucesivamente, hasta alcanzar un número enorme de copias del DNA original (Figura 3). Debido a que la

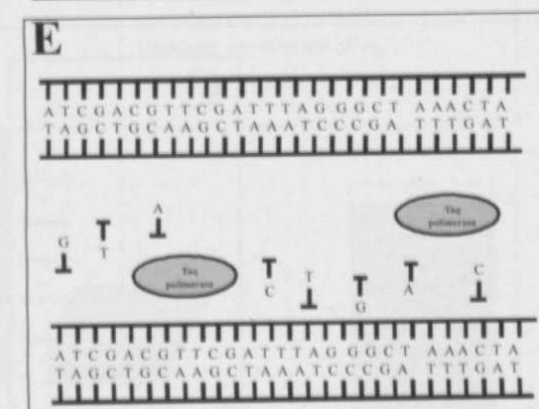
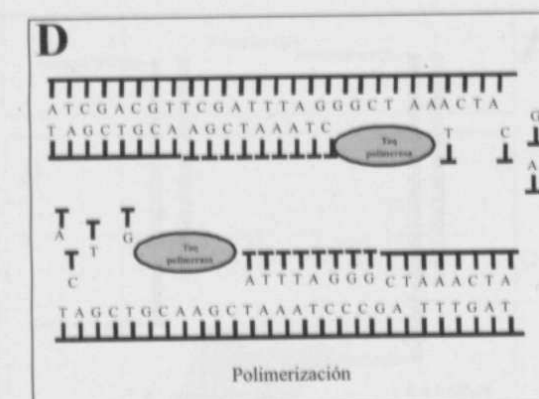
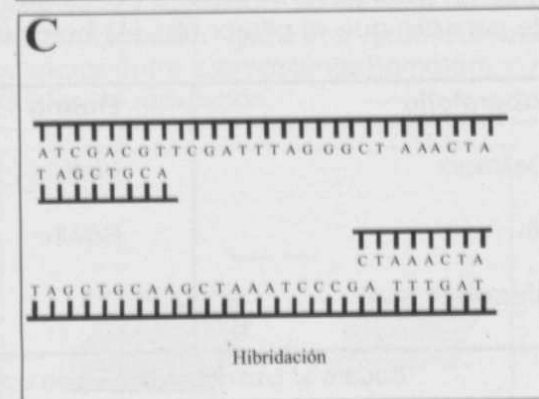
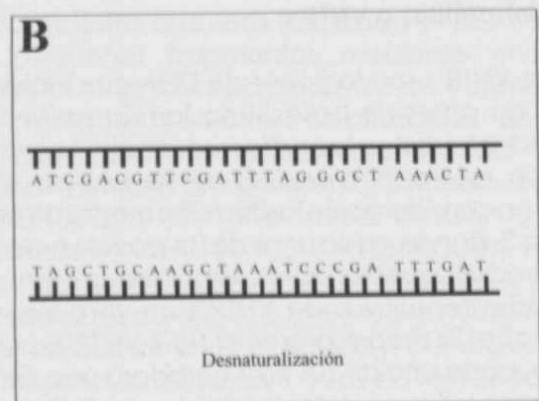
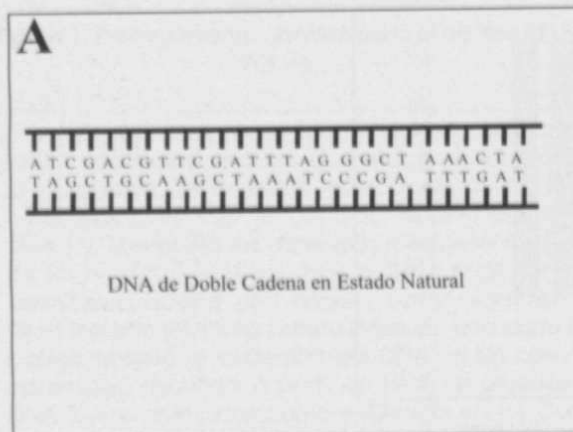


Figura 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

amplificación es casi ilimitada, los métodos basados en PCR hacen posible el análisis de pequeñas cantidades de DNA, ventaja que hace a la técnica apta para estudios forenses, en los que las cantidades de DNA en algunas muestras tales como cabello o trazas de saliva en colillas de cigarro son mínimas. Otra ventaja de los métodos basados en PCR es que, usualmente, permiten la identificación exacta de cada alelo. Una vez que la muestra de DNA es amplificada por métodos de PCR, el análisis se lleva a cabo esencialmente de la misma manera como en el caso de los VNTR's. Hay algunas pequeñas modificaciones en el procedimiento, pero el proceso general es el mismo (identificación de fragmentos de tamaño diferente por su migración en un campo eléctrico) (4, 14).

### Repetidos en Grupos Cortos (STR's)

Los STR's son similares a los VNTR's y el principio general para usarlos es el mismo. Los STR's difieren de los VNTR's en que las unidades repetidas son más pequeñas (2 a 7 bases) y el tamaño total de un STR es más pequeño (menos de 1 Kb). Además, mientras que para VNTR's todo el DNA de la célula se encuentra en el gel de electroforesis, con STR's sólo la región de interés se amplifica por PCR. En aplicaciones forenses, los fragmentos STR's amplificados y separados son generalmente detectados, empleando uno de los dos métodos disponibles. Un método aprovecha la propiedad de la plata para unirse al DNA. El gel completo es teñido con plata, observándose bandas oscuras. Otro método, cuyo uso se incrementa cada día, requiere que

alguno de los iniciadores usados durante la amplificación contenga marcas fluorescentes incorporadas a los fragmentos STR's generados durante la PCR. Luego de la separación de los fragmentos por electroforesis, se emplea un instrumento óptico para detectar la posición de los productos fluorescentes separados (4, 13, 14).

### Sistema Índice de DNA Combinado (13-CODIS)

El FBI ha diseñado 13 loci específicos STR's como un juego central para ser usado para relacionar materiales de la escena del crimen con individuos tipificados previamente (Cuadro 2) (4, 12, 14). Debido a que los laboratorios en todo EUA emplean los mismos loci, se facilita la comparación y cooperación entre laboratorios. Colectivamente, los 13 loci tienen alto poder discriminatorio. La probabilidad de encontrar el mismo perfil de dos personas no relacionadas en una población de americanos caucásicos es de  $1.68 \times 10^{-15}$  o uno en 594 trillones. El FBI proporciona el software necesario para facilitar el uso del sistema 13-CODIS junto con la instalación, adiestramiento, el apoyo al usuario para cargar la información y protección a los laboratorios que lo aplican. El 13-CODIS usa dos sistemas de bases de datos en los que se carga la información obtenida de evidencias biológicas: el Índice de Delinquentes Convictos que contiene los perfiles de convictos de crímenes violentos y el Índice Forense, que contiene perfiles de DNA de evidencias de la escena del crimen (4, 12, 13, 14).

| Locus   | Número de Alelos | Americanos caucásicos<br>P.R.P. <sup>1</sup> | Afroamericanos<br>P.R.P |
|---------|------------------|--|-------------------------|
| CSF1PO  | 11               | 0.112  | 0.081                   |
| TPOX    | 7                | 0.195  | 0.090                   |
| TH01    | 7                | 0.081  | 0.109                   |
| VWA     | 10               | 0.062  | 0.063                   |
| D16S539 | 8                | 0.089  | 0.070                   |
| D7S820  | 11               | 0.065  | 0.080                   |
| D13S317 | 8                | 0.085  | 0.136                   |
| D5S818  | 10               | 0.158  | 0.112                   |
| FGA     | 19               | 0.036  | 0.033                   |
| D3S1358 | 10               | 0.075  | 0.094                   |
| D8S1179 | 10               | 0.067  | 0.082                   |
| D18S51  | 15               | 0.028  | 0.029                   |
| D2S11   | 20               | 0.039  | 0.034                   |
| Uno en  |                  | $5.94 \times 10^{14}$                        | $9.33 \times 10^{14}$   |

<sup>1</sup> Probabilidad Relativa de Población.

**Cuadro 2.** Número de alelos y probabilidad de relación de la población en americanos caucásicos y afroamericanos para los 13 loci del CODIS (14)

### Polimorfismos De Nucleótido Sencillo (SNP's)

Los SNP's representan alteraciones en la secuencia de DNA en la posición de un nucleótido, debido a cambios de base, inserción o delección de una o unas pocas bases. Con la determinación directa de la secuencia de DNA en el genoma, se observaron variaciones en las bases, en proporción de una en cada 1000 bases a lo largo del genoma. Actualmente, varios loci que presentan polimorfismos están siendo catalogados para poder incrementar el poder discriminatorio y emplearlos para la identificación de individuos.

### Microarreglos y "Chips" de DNA

La combinación de nanotecnología, química y biología molecular han llevado a la generación de los microarreglos de DNA que permiten el rápido análisis de muestras de DNA. Los microarreglos contienen gran número de sondas, cada una con secuencia diferente, fijas sobre una superficie sólida en una posición definida. Las sondas pueden ser oligonucleótidos sintéticos o pequeñas moléculas de DNA complementario (cDNA's), las cuales podrían corresponder a secuencias únicas que se encuentran contenidas a lo largo del genoma humano y que son únicas para cada individuo. El método común de síntesis de oligonucleótidos involucra la adición de nucleótidos uno por uno al extremo del oligonucleótido creciente. La secuencia está determinada por el orden en el cual el sustrato de nucleótidos es adicionado a la mezcla de reacción. Para dirigir el alargamiento de una sonda de oligonucleótidos se realiza fotolitografía, que consiste en la síntesis dirigida por luz. El arreglo es incubado con el DNA blanco (que puede corresponder al DNA extraído de una muestra encontrada en la escena del crimen o de una muestra en una disputa legal de paternidad), permitiendo la hibridación en un lugar determinado donde se encuentra su secuencia complementaria correspondiente al oligonucleótido fijado en la placa. Cuando los oligonucleótidos han hibridado con el DNA blanco, se realiza una búsqueda sobre la superficie del arreglo y el estudio sobre las zonas de hibridación. La señal fluorescente es detectada por un láser o por microscopía confocal fluorescente (Figura 4) (1, 2, 6). Con esta técnica es posible determinar SNP's a lo largo del genoma y luego realizar una

comparación de las zonas de hibridación ya sea de un sospechoso con el material encontrado en la escena del crimen o determinar el modelo de herencia genética que se logra en una disputa legal de paternidad.

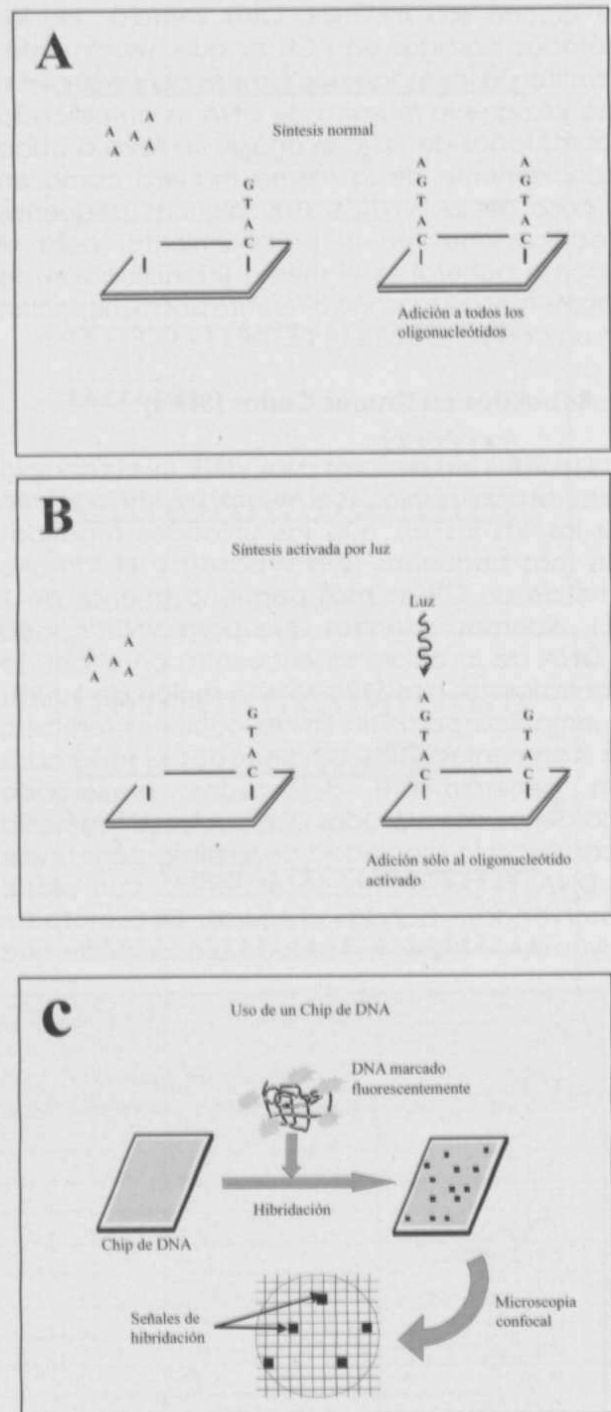


Figura 4. Procedimiento de los microarreglos de DNA (1, 2).

### DNA Mitocondrial

Las mitocondrias son organelos encontradas por cientos en cada célula del cuerpo humano. Las mitocondrias llevan su propio material genético en copias múltiples de pequeñas piezas de DNA circular de alrededor de 16,500 pb en total. Un aspecto inusual del DNA mitocondrial (mtDNA) es su modelo de herencia. El mtDNA es heredado exclusivamente en línea materna. Una región particular del mtDNA conocida como rizo D (D-loop) se ha identificado como región hipervariable en individuos no relacionados. Esta región es generalmente estable a través de generaciones; así, la versión de esta región en un niño nunca varía con respecto a la de su madre, hermana, hermano, abuela, tíos, tías y otros parientes maternos. Desde 1990, los científicos han aprovechado la ventaja de la PCR y el modelo de herencia del mtDNA para identificar a niños que fueron secuestrados y vendidos en el mercado negro en Argentina entre 1975 y 1983. Los niños, ahora jóvenes entre 29 y 21 años de edad, fueron relacionados con sus parientes biológicos sobrevivientes debido

a que el mtDNA de un niño sobreviviente es el mismo al de cualquier pariente materno (12, 14).

### CONCLUSIONES

El presente trabajo describe, de manera breve, las técnicas más importantes dentro del área de la Biología Molecular para la identificación de individuos. Todas las técnicas aprovechan la variabilidad del genoma y dichas variaciones permiten comparar los perfiles de una muestra biológica de la escena de un crimen, por ejemplo, con el perfil de DNA del(los) sospechoso(s), determinando o no su participación en el crimen. Otro uso es en disputas legales de paternidad, donde, por comparación de alelos de los presuntos padres del niño, es posible determinar al padre biológico. También se comentó el posible uso para el seguimiento e identificación de posibles familiares en casos donde se desconoce si existe relación familiar o no. Sin duda, los avances científicos cada vez se involucran más en la vida social, permitiendo resolver problemas que antes sólo dependían de la subjetividad personal.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Brown, T.A. 2002. *Genomes*. 2nd ed. Wiley-Liss. London. pp. 130-133.
2. Butte, A. 2002. *The Use and analysis of microarray data*. *Nature Drug Disc.* 1: 951-960.
3. Cifuentes, L.; Aguirre, R.; Armaet, L.; Castillo, S.; Cruz-Coke, R.; Etcheberry, A.F.; Llop, E. 1996. *Identificación Genética y Pruebas de Paternidad*. Ed. Universitaria. Santiago, Chile. pp. 17-160.
4. Crow, F.J.; Berger, M.A.; Diamond, S.S.; Kaye, D.H.; Kazazian, H.H.; Motulsky, A.G.; Nagylaki, T.A.; Nei, M.; Sensabaugh, G.F.; Siegmund, D.O.; Stigler, S.M. 1998. *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. National Academy Press. Washington D.C. pp. 60-73.
5. Étienne, J. 2001. *Bioquímica genética y Biología Molecular*. Masson. México. 491 p.
6. Feng, L.; Nerenberg, M. 1999. *Electronic microarray for DNA analysis*. *Gene Ther. Mol. Biol.* 4: 183-191.
7. Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S.L. 1985. "Individual-specific 'fingerprints' of human DNA". *Nature* 316: 76-79.
8. Jeffreys, A. J.; Brookfield, J. F.Y.; Semeonoff, R. 1985b. "Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints". *Nature* 317: 818-819.
9. Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press. New York. 990 p.
10. Panduro, A. 2000. *Biología Molecular en la Clínica*. McGraw-Hill. México. 348 p.
11. Pennisi, E. 2001. "The Human Genome". *Science* 291: 1177-1180.
12. Rudin, N.; Inman, K. 2001. *An Introduction to Forensic DNA Analysis*. CRC Press. USA. pp. 41-81.
13. U.S. Congress. Office of Technology Assessment. 1990. *Genetic Witness: Forensic Uses of DNA Tests*. Washington, DC. 185 p.
14. U.S. Department of Justice. Office of Justice Programs. National Institute of Justice. 2000. *The Future of Forensic DNA Testing*. Washington, DC. 82 p.
15. Venter, C. et al. 2001. "The Sequence of the Human Genome". *Science* 291: 1304-1351.
16. Weaver, R.F. 2002. *Molecular Biology*. 2nd ed. McGrawHill. New York. pp. 786-793.
17. Williamson, R.; Duncan, R. 2002. "DNA testing for all". *Nature* 418: 585-586.

[Faint, illegible text in the left column]

[Faint, illegible text in the right column]