

## Crónica sobre el impacto de la tecnología del ADN en las Ciencias Forenses

Gerardo Arroyo Cruzado  
Recinto de Río Piedras, Universidad de Puerto Rico  
[g\\_arroyocruz@yahoo.com](mailto:g_arroyocruz@yahoo.com)

### Resumen

El acelerado desarrollo de la tecnología del ADN, durante los años setenta y ochenta del pasado siglo, impactó a su vez en gran medida a otras áreas de las Biociencias así también a la Antropología y las Ciencias Forenses. Para esta última se desarrolla un innovador instrumento para la identificación de sujetos, el análisis forense del ADN. Mediante el conjunto de procedimientos y técnicas que se integran bajo la tipificación del ADN se pretende analizar el polimorfismo en longitud de regiones repetitivas en los cromosomas llamados minisatélites (VNTR) y/o microsátélites (STR). Se integra también el análisis de variaciones en la secuencias hipervariables del ADN mitocondrial. En este trabajo se describe como el descubrimiento del británico Alex Jeffreys sobre perfiles de ADN converge en los ochenta con el invento de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del estadounidense Kary Mullis. Esta convergencia resulta en el surgimiento de una nueva especialidad, la genética forense. Cada nuevo adelanto tecnológico impulsa nuevas fases en este campo forense. Cada nueva fase origina a su vez polémicas sobre aspectos jurídicos, sociales y éticos. En esta crónica sobre las “pruebas del ADN” se discuten las innovaciones tecnológicas y las polémicas más relevantes. Se expone también como se integró la tipificación del ADN como parte de la criminalística en Puerto Rico y las expectativas de su rol en el avance de la solución de casos.

Palabras clave: análisis forense del ADN, tipificación del ADN, ADN mitocondrial, CODIS, cadena de custodia

### Abstract

The accelerated progress in DNA technologies, during the 1970's and 1980's had a great impact not only in the Biosciences but also in the areas of Anthropology and Forensic Sciences. For the latter, it has been developed an innovative instrument that has caused a breakthrough in subjects identification, the forensic DNA analysis. Through a set of procedures and techniques which conform the DNA typing, it is expected to analyze the polymorphism concerning to the length of certain repetitive regions of the chromosomes known as minisatellites (VNTR) and/or microsattellites (STR). This work includes the analysis of mitochondrial DNA hypervariable sequences. The discoveries of DNA profiles from British, Alex Jeffreys and the convergence with the polymerase chain reaction

technique (PCR) developed by the north-American Kary Mullis are described . This convergence results in the birth of a new discipline, the forensic genetic. Each advance in technology drives a new stage into forensics. As an effect, every new stage originates a controversy in legal, social and ethical aspects. In this account of “DNA test” the most relevant technological innovations and polemics are discussed. It is also exposed how was integrated the DNA typing as part of the criminalistics in Puerto Rico and the expectatives for its role in case resolution.

Keywords: forensic DNA analysis, DNA typing, mitochondrial DNA, CODIS, chain of custody

## Introducción

La divulgación del modelo de la estructura de doble hélice de ADN por James Watson y Francis Crick, en 1953, abrió la puerta a importantes descubrimientos bioquímicos. A principios de los años sesenta del pasado siglo, diversos investigadores llevaron a cabo ingeniosos y elegantes experimentos con los que identificaron las piezas moleculares que conformaban la maquinaria celular para la síntesis de proteína. El desciframiento del código genético, el descubrimiento del ARN mensajero y los ARN de transferencia, así como el determinar la dirección en que se ensamblan las proteínas fueron descubrimientos claves para el entendimiento de la fisiología celular (Johnson, 1996).

En 1970 se descubre y se purifica la primera enzima de restricción (proteína que corta el ADN en secuencias específicas). El descubrimiento resultó de gran relevancia, pues permitió fragmentar y modificar vectores tales como los plásmidos (ADN extracromosomal en algunas especies de organismos como bacterias y levaduras) para insertarles secuencias de ADN de otras especies. La tecnología de ADN recombinante estaba en surgimiento. (Watson, 1983)

La integración del plásmido pSC101 conteniendo un gen de ARN ribosomal perteneciente a la rana africana *Xenopus leavis* en las células de *Escherichia coli* da comienzo a la ingeniería genética en 1973 (Johnson, 1996). La bacteria transformada se convierte en el primer organismo transgénico. En la segunda mitad de la década de los 1970 se publican diversos procedimientos para la secuenciación de regiones de ADN, o lo que es lo mismo que identificar la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN de interés. El conjunto de estos y otros descubrimientos e innovaciones tecnológicas aceleraron el proceso de identificación de diversos genes de multiplicidad de organismos de interés para los investigadores, entre ellos por supuesto, varios genes de humanos. Así, a finales de la década de los 1970 y principios de los 1980 comienza la producción de fármacos utilizando procedimientos de ADN recombinante.

La bacteria *E. coli* era utilizada para producir proteínas humanas tales como insulina, hormona de crecimiento y hormona de crecimiento epidérmico entre otras. La producción de fármacos mediante tecnología de ADN recombinante en unión al gran desarrollo de industrias que manufacturaban instrumentos y materiales para la investigación resulta en un esperado auge económico que inyecta miles de millones de dólares a las economías de los países industrializados. De estos eventos surge la segunda generación de la biotecnología (Arroyo-Cruzado, 2011).

Fue, por otro lado, fascinante y sorpresivo para los biólogos moleculares, juristas y el ciudadano común observar en los 1980 como la tecnología del ADN se aplica para el análisis de muestras biológicas recolectadas durante una investigación criminal. Este fenómeno converge con uno de los inventos más innovadores de la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa, (PCR, su acrónimo en inglés) para proveer a las Ciencias Forenses una de las herramientas más efectivas en la identificación de sujetos.

### **Las secuencias minisatélites en la tipificación del ADN**

En los comienzos de la década de los 80, el doctor Alec Jeffreys, catedrático de la Universidad de Leicester, en el Reino Unido, trabajaba en proyectos dirigidos a identificar variaciones o mutaciones en el ADN que pudieran originar condiciones genéticas. Para esto utilizaba como técnica primaria la digestión del ADN mediante enzimas de restricción (Inman y Rudin, 1997). Los fragmentos de ADN resultantes de las reacciones enzimáticas eran separados en una gel de agarosa a la que se aplica una corriente eléctrica. El ADN es una molécula netamente negativa y la gel se utiliza como filtro de manera que los fragmentos más pequeños se adelantan hacia el polo positivo más rápido mientras que los más grandes se retrasan por la fricción ejercida por la matriz gelatinosa. Tras diversos tratamientos a la muestra de ADN fragmentada se puede analizar el patrón de bandas de una región específica de ADN. Un individuo que carga una mutación en esa región, podría mostrar un patrón de migración de fragmentos diferente al de otros individuos, esto es, un perfil de ADN diferente para la secuencia estudiada. Mutaciones que originan la enfermedad de Huntington (desorden neurológico) y la fibrosis quística fueron identificadas por esta técnica (Collin et al., 1997) la cual se conoce como polimorfismo longitudinal de fragmentos de restricción (RFLP su acrónimo en inglés).

A través de sus estudios, el doctor Jeffreys observó que al analizar mediante la RFLP regiones de ADN repetitivas y no codificantes conocidas como minisatélites (por estar localizados en la periferia de genes codificantes) resultaba en un gran número de variantes de perfiles de ADN entre individuos bajo estudio. Aún mayor era la diferencia en “perfiles” si se analizaban varias regiones de repeticiones (multilocus) en la misma prueba (Jeffreys et al. 1985). La diferencia en el patrón de bandas era causada por variaciones en el número de repeticiones que podía contener cada persona en las diversas regiones repetitivas de su ADN o sea, los minisatélites eran secuencias que mostraban polimorfismos de longitud dentro de una población e incluso entre miembros de un mismo grupo familiar. Jeffreys infiere entonces que los minisatélites podrían actuar como huellas genéticas (DNA fingerprint). Técnicamente los minisatélites son secuencias de ADN que se repiten consecutivamente. Estas repeticiones pueden ser en algunos casos de diez nucleótidos aunque otras pueden llegar a veinte o más nucleótidos. Las más comunes son de 14 a 16 nucleótidos (Jeffreys y Pena, 1993). El conjunto total de repeticiones en un minisatélite puede llegar a contener más de mil pares de nucleótidos (A, T, C, G). Hay diferentes minisatélites distribuidos a través de los cromosomas (moléculas de ADN en el núcleo celular que cargan los genes). La especie humana tiene 23 pares de cromosomas con excepción de los gametos o células sexuales los cuales en su desarrollo han sufrido una reducción en el número (contienen solo 23). Debido a que un minisatélite correspondiente a un locus (sitio cromosomal) puede contener diferentes números de repeticiones entre individuos, la literatura se refiere a ellas con el nombre técnico de repeticiones consecutivas que varían en número (Variable Number of Tandem Repeats o VNTR por su acrónimo en inglés).

La técnica de análisis VNTR-RFLP es un proceso laborioso (toma al menos dos semanas) con el cual, el investigador o técnico de laboratorio debía observar rigurosas medidas de seguridad debido a que se trabaja con materiales de alto riesgo para la salud tales como fenol y cloroformo que son utilizados para el aislamiento del ADN (producen gases tóxicos y son muy abrasivos si entran en contacto con la piel) y del uso de oligonucleótidos marcados con algún isótopo radioactivo como  $^{32}\text{P}$  (Vázquez et al., 2003) para identificar los fragmentos de ADN de interés. Luego de recibirse en el laboratorio forense las muestras biológicas correspondientes a una investigación criminal (el recogido, registro y traslado de la muestra debe seguir el protocolo de cadena de custodia de la jurisdicción en donde ocurrieron los hechos), estas se sometían a procesos químicos y calor para romper las membranas celulares. El ADN

genómico se aislaba mediante extracción orgánica (fenol-cloroformo). Entonces las muestras se sometían a digestión con una enzima de restricción. La mezcla de fragmentos resultantes se cargaba en un espacio o fosa de la gelatina (cada fosa contiene una muestra diferente). Al someterle a un campo eléctrico los fragmentos de ADN se separan de acuerdo a su tamaño. Cada muestra ocupa un carril particular en el gel. Para identificar los fragmentos de VNTR de interés, la muestra de ADN se debía tratar químicamente para separar las dos cadenas de ADN una de la otra (desnaturalizar). Entonces las muestras de ADN se transferían a una membrana de nilón o nitrocelulosa mediante la técnica de Southern.

Los fragmentos de ADN están localizados en la membrana en la misma posición en referencia al gel. Una pequeña secuencia de nucleótidos de cadena sencilla (oligonucleótido) complementaria a alguna región del VNTR se marcaba radioactivamente para ser usada como

sonda (permite señalar la presencia del VNTR de interés). Luego de tratarse la membrana con diversas soluciones amortiguadoras se aplicaba la sonda. Pasado el tiempo que dictaba el procedimiento, se lavaba la membrana con soluciones salinas para eliminar el exceso de sonda. A continuación, se colocaba una placa de rayos X sobre la membrana (en un cartucho para placas) y se dejaba hasta el siguiente día (Fig.1). La placa se revelaba, lo que permitía observar e interpretar los patrones de bandas (perfiles) de cada muestra de ADN colocada en el gel (Fig.2). Para finales de los 90 los avances en la tecnología del ADN harán caer en desuso esta técnica de tipificación.

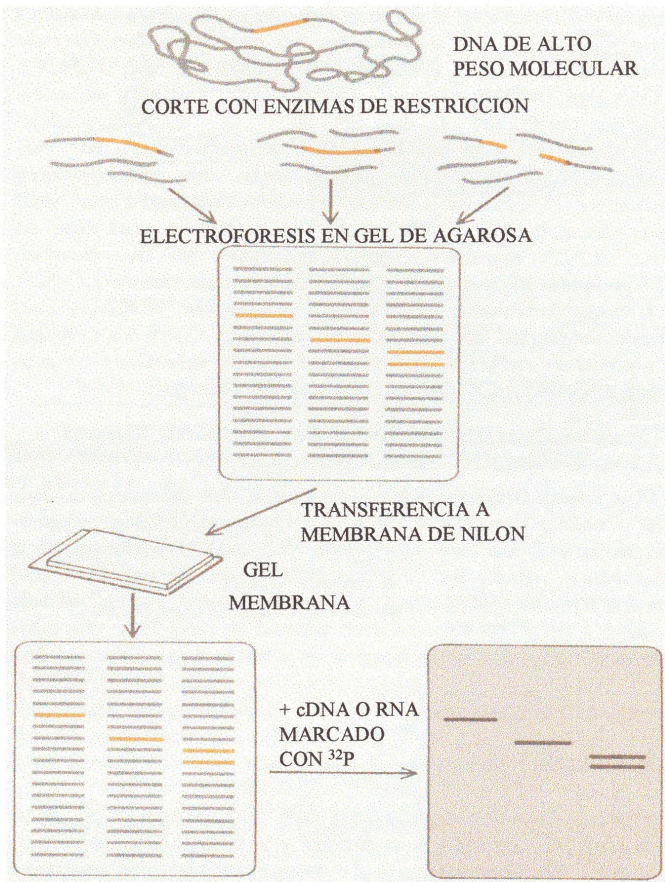
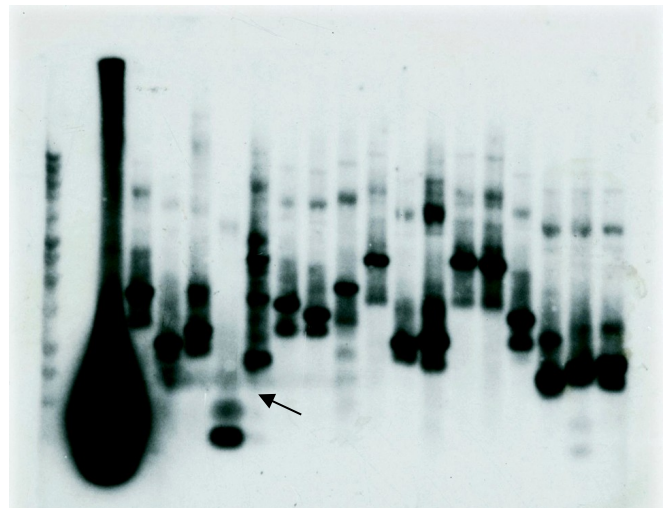


Fig. 1. Flujograma que del procedimiento para el análisis de perfiles de ADN mediante la técnica de

RFLP.

Figura 2. Autoradiografía que muestra el reconocimiento de un gen de interés mediante el uso de una sonda radioactiva. Las señales corresponden a genes de ARN de transferencia de *Nephila clavipes* obtenidos durante los trabajos que el autor ha llevado a cabo sobre el genoma de esta araña.



Para Jeffreys la oportunidad de poner a prueba su hipótesis llegó pronto. Las autoridades británicas de inmigración le solicitaron que utilizara las técnicas de tipificación de ADN, para resolver un caso en que se prohibió la entrada de un niño de origen africano al Reino Unido alegando que su documentación era falsa. La prueba del ADN confirmó que el niño era hijo y hermano de personas de origen africano residentes del Reino Unido, siendo este el primer caso de relaciones paterno-filiares que se confirmó mediante tipificación de ADN (Jeffreys, et al., 1985). En el aspecto criminal, las autoridades forenses británicas le pidieron a Jeffreys analizar muestras biológicas de dos casos de violación y homicidio ocurridas en el pueblo de Narborough. Los dos asesinatos de mujeres jóvenes ocurrieron con una diferencia de tres años (1983 y 1986). Se pudo extraer ADN en buen estado de la muestra de semen dejada en ambas víctimas. La tipificación del ADN mostró que el violador y homicida había sido el mismo sujeto en ambos casos, pero el “perfil del ADN” del sospechoso bajo custodia no coincidía con el de las muestras de semen recopiladas de los cuerpos de las víctimas. Fue así como se liberó al primer acusado de homicidio utilizando los perfiles de ADN como evidencia. Esta es la primera muestra de que la tipificación de ADN puede ser útil como técnica de exclusión (Bernath, V, 2008). Confidencias y declaraciones de ciudadanos del pueblo dirigían a un segundo sospechoso. Se le toman muestras de sangre para extraer su ADN y procesarlo para un análisis de multilocus de VNTR mediante RFLP. El perfil del ADN del sospechoso coincidía con el del semen recopilado de las víctimas (Fig.3). En 1988, Colin Pitchfork se convirtió en la primera persona condenada a prisión, utilizando como evidencia la prueba de ADN (Jeffreys y Pena, 1993).



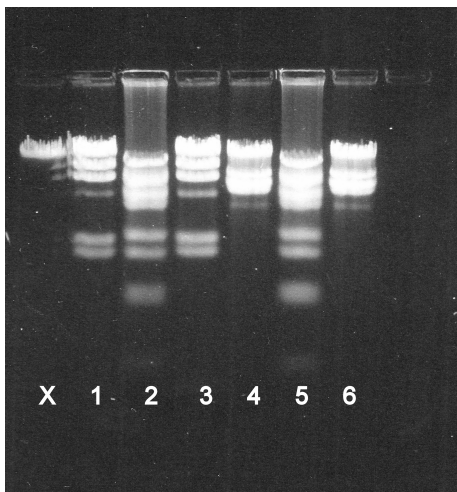


Figura 3. Simulación de una tipificación de ADN mediante la técnica de RFLP. Se observa como coinciden en el patrón de bandas (perfiles) los carriles 1 y 3, 2 y 5, 4 y 6. El carril x contiene ADN de alto peso molecular sin digerir. El caso simulado fue diseñado por el autor para utilizarlo como experiencia de laboratorio en el curso sobre análisis forense del ADN que ofrece como parte de su cátedra.

La noticia de esta nueva prueba forense cruzó a los Estados Unidos de inmediato para ser utilizada en el caso de un sospechoso de violación en serie. Tommie Lee Andrews se convierte en la primera persona en Estados Unidos en ser convicta con la ayuda del ADN como evidencia (el Pueblo vs. Andrews, Estado de la Florida, 1988).

### **La defensa desafía a las pruebas del ADN**

Las tipificaciones de ADN en sus comienzos jurídicos debían pasar para cada caso en corte el cedazo de las audiencias Frye antes de ser admitida como evidencia. En estas audiencias, cuyo nombre proviene de un caso de 1923 que sirve de precedente, se evaluaban los principios científicos o tecnológicos novedosos bajo el siguiente estatuto (Saferstein, 2007).

Quando un principio científico o descubrimiento cruza la línea de lo experimental y las fases demostrables son difíciles de definir, entonces se debe reconocer la capacidad evidenciaria del principio estableciendo categóricamente que el descubrimiento o principio científico sobre el cual se ha hecho la deducción ha ganado aceptación con el campo particular al que pertenece.

Este estatuto siempre le pareció ambiguo a los juristas, sobre el aspecto de cuál es la comunidad científica a la que le compete aceptar los principios científicos y la tecnología concerniente (Walsh, 1999). En relación a las pruebas del ADN, surgieron múltiples interrogantes: ¿A quién le correspondería ofrecer esa aceptación, a los investigadores que trabajan con ADN de cualquier organismo, como bacterias, moscas o únicamente a aquellos que trabajaban con ADN humano? ¿Qué aspecto de la técnica y proceso de análisis de la evidencia estarían bajo evaluación: el procedimiento para obtener el perfil de ADN (digestión

con enzimas de restricción, electroforesis, transferencia del ADN a membranas, hibridación con ondas radiactivas) o los cómputos estadísticos basados en información sobre genética poblacional? Un segundo estatuto que era visto como un estándar más laxo para la admisión de evidencia fue adoptado por muchas cortes estatales en Estados Unidos. Este provenía de las reglas federales promulgadas por la Corte Suprema y establecidas por el Congreso estadounidense en 1975 (Walsh, 1999). La Regla 702 concerniente a admisibilidad establece:

Si algún conocimiento científico, técnico, o especializado es utilizado para asistir al examinador de los hechos a entender la evidencia o determinar algún aspecto en el issue concerniente, un testigo calificado como un experto por conocimiento, destreza o experiencia puede testificar proveyendo su opinión.

Aquí comienza una pesadumbre para los abogados de la defensa pues para el 1989 se había utilizado la prueba del ADN en cerca de mil investigaciones criminales. De este conjunto, solo en unas docenas de casos se cuestionó dicha prueba (Neufeld y Colman, 1990). Se evidencia para ese momento que muchos abogados defensores no disponían de tiempo o recursos necesarios para enfrentarse con la complejidad de estas nuevas tecnologías. Además, en la mayoría de los estados un abogado de servicios legales no contaba con un perito experto si no era aprobado por el juez. Junto a estas desventajas, se añadía que para muchos miembros de los jurados, las declaraciones de los peritos sobre estas pruebas parecían más una lección de Biociencias, por lo que las tomaban como ciertas, infalibles e incuestionables (Neufeld, y Colman, 1990).

En 1989, dos jóvenes abogados, Peter Neufeld y Barry Scheck lograron que la prueba de ADN fuera suprimida como evidencia por primera vez en un caso criminal en una corte estadounidense. El Pueblo vs. Castro (545 N.Y.S. 2<sup>d</sup> 985, Sup. CE. 1989), se convirtió en precedente y sirvió como cimiento para que los juristas pudieran rebatir sobre diversos aspectos y componentes de estas pruebas. La tipificación del ADN mostraba vulnerabilidad.

En los años subsiguientes se producen enfrentamientos entre el bando de juristas de defensa y los que componían el bando de la criminalística tales como fiscalía, investigadores de todo nivel (estatales y federales) e incluso laboratorios privados que pretendían hacer un gran negocio con esta trayectoria que había tomado la genética molecular. Tres aspectos de las técnicas de tipificación de ADN fueron cuestionados y criticados contundentemente. La primera



correspondía a la falta de estándares establecidos por una autoridad fiscalizadora que sirviera de guía para el procesamiento de la muestra de ADN. El FBI y Compañías como *Cellmark Diagnostics* y su competidora *Lifecode* pretendían mantener sus protocolos experimentales en resguardo, negándose a mostrarlos como parte del descubrimiento de prueba en corte. Su justificación era bajo la premisa de propiedad intelectual. Al tener que acceder a mostrar sus protocolos se pudo evidenciar diferencias marcadas en diversas fases del procedimiento. La crítica a la falta de estándares era justificada (Neufeld, y Coman, 1990).

El segundo aspecto bajo crítica correspondía al fenómeno conocido como desplazamiento de bandas (fragmentos de ADN) en la electroforesis. Todo biólogo molecular ha observado alguna vez en sus electroforesis, la manera en que una muestra de ADN de un mismo origen presenta un patrón de movilidad diferente al compararse dos carriles en un mismo gel. Diversas causas pueden originar el desplazamiento de bandas como por ejemplo, variaciones en voltaje, diferencias en concentración de ADN, en concentración de salina (Rivera y Rodríguez, 1991). Esto llevaba a evaluar los perfiles bajo estudio utilizando factores de corrección, con el riesgo de adjudicar un pareo de manera incorrecta incriminando así a un inocente (Neufeld, y Colman, 1990).

La crítica más relevante que recibían las pruebas de ADN era sobre los fundamentos de genética poblacional en los que se basaban los datos estadísticos que se presentaba en corte. La estadística permitía establecer el índice de probabilidad con el que cierta muestra de ADN podía asociarse con cierta persona (acusado, víctima). Para los primeros años de los 90 se había dejado de visualizar las pruebas de ADN como unas que permitían la individualización (ningún otro humano tiene el mismo perfil de ADN). Es por eso que dejan de llamarse huellas del ADN (DNA fingerprinting) y se les comienza a llamar perfiles del ADN (DNA profiling).

Entonces, se llevan a cabo investigaciones, con las cuales se pretendía corroborar que los diversos locus o marcadores utilizados en las pruebas de ADN forense cumplieran con el equilibrio Hardy-Weinberg para alelos en una población multiétnica como la de Estados Unidos. La presión se dejó sentir sobre los defensores de las pruebas de ADN forense, lo que obligó a hacer estudios sobre la frecuencia de los marcadores de interés en diversos grupos étnicos tales como caucásicos, afroamericanos e hispanos (Budowle, B. et al, 1991). Aun así, las críticas continuaban, pues tomando el ejemplo de los hispanos, se podía asumir que

existían subpoblaciones dentro de este grupo dado el caso de que sus ancestros podían ser muy variados, mostrando mayores similitudes alélicas entre individuos de una misma subpoblación (ej. puertorriqueño con otro puertorriqueño), que con individuos hispanos de otras subpoblaciones (puertorriqueño con guatemalteco). La genética poblacional se convirtió en el área de las Ciencias Naturales que mayor influencia ejercía en la subsistencia o desaparición de las jóvenes pruebas del ADN en los tribunales.

A partir de ese momento, renombrados genetistas han llevado a cabo abarcadores estudios poblacionales tanto para los marcadores de VNTR de principios de los 1990, como para los que comenzarían a utilizarse más adelante, conocidos como microsatélites (se discutirán en la próxima sección). Se han preparado bases de datos para subpoblaciones de hispanos, orientales y amerindios entre otros. Estas investigaciones conllevan una gran cantidad de trabajo, pues luego de identificar la subpoblación de interés, se debe establecer la muestra apropiada para el estudio (número de individuos) y llevar a experimentación los diversos marcadores útiles para las pruebas forenses. Estudios similares se han llevado a cabo en diferentes países en que han sido validadas las pruebas de ADN para las cortes (Budowle, et al., 1991; Martin, et al., 2001; Budowle, 2003; Gill, et al., 2006).

Otra línea de ataque que utilizan los abogados para excluir las pruebas del ADN en los casos que atienden, es hacia la cadena de custodia. Aquí indagan por fallas tales como el transporte o almacenamiento impropio de la muestra y errores en el registro de entrada y uso de ésta para los análisis (Coleman, y Swenson, 1994). El caso de O.J. Simpson en 1994, es el mejor ejemplo de ataque a la cadena de custodia con el fin de neutralizar las pruebas del ADN (Bernath, 2008). El menor error detectado en la cadena de custodia podría invalidar la evidencia.

Un aspecto que también exploran los abogados para la defensa, es la posibilidad de degradar la confiabilidad del testimonio del perito científico. Se trata de establecer algún conflicto de interés del perito con alguna de las partes en juicio, y hasta escudriñan su vida profesional y personal, en busca de sucesos en su pasado que sirvan para socavar su credibilidad (Roberts, 1992).

## El análisis de microsatélites mediante la PCR

En los 1980, mientras Alec Jeffreys divulgaba su descubrimiento de un método de identificación utilizando el ADN, otro investigador, el estadounidense Kary Mullis, inventaba la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por su acrónimo en inglés), un método para amplificar el ADN *in vitro* (Mullis, et al, 1986). Esto es, hacer un gran número de copias de éste a partir de un segmento de ADN. La técnica requiere, además de la muestra de ADN, una enzima termoestable (polimerasa Taq), oligonucleótidos que sirvan de iniciadores para la reacción, desoxinucleótidos, cofactores enzimáticos como magnesio y una fuente de calor capaz de variar la temperatura a gran velocidad (temociclador). En pocos años la técnica fue fundamental en acelerar proyectos en diversas áreas de las Biociencias, tales como inmunología, genética, farmacología, biotecnología y otros campos relacionados, como la Antropología molecular o la Genética forense. La gran aportación de la PCR a esta diversidad de áreas del conocimiento, le ganó el reconocimiento mundial al doctor Mullis y se le otorgó el premio Nobel de Química (compartido) en 1993 (Fig. 4).

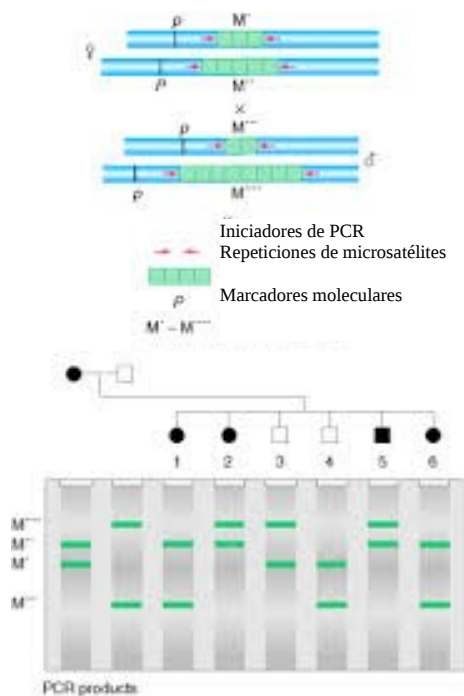


Figura 4. Flujoograma que ilustra la amplificación mediante la técnica de PCR de muestras de varios individuos de una familia y los diferentes perfiles de ADN que resultan.

La nueva técnica trae innovaciones importantes a las pruebas de ADN forense. Ahora se requería una muestra mil veces menor de ADN (100 pico gramos o  $10^{-12}$ ). Otra ventaja es que el ADN a ser analizado puede estar fragmentado o desnaturalizado. A estas ventajas se

agrega el desarrollo de procedimientos simples para la extracción de ADN como el de resina Chelex, el cual remueve inhibidores de PCR y utiliza un solo microtubo durante la extracción, reduciendo el potencial de contaminación en el laboratorio (Butler, 2005). El PCR permitía ahora utilizar pequeñas muestras de ADN extraídas de orina, saliva, sellos de correo, raíz de cabello, colillas de cigarrillos y hasta de las pocas células epiteliales dejadas con las huellas dactilares al tocar algún objeto (Butler, 2005).

Esta nueva etapa del análisis forense del ADN requería de nuevas pruebas de validación en las diversas fases del protocolo. Una de las más notable fue la utilización de los microsatélites como las secuencias a ser evaluadas en la tipificación. Los microsatélites son secuencias repetitivas más cortas que los VNTR. Las más comunes rondan los 4 a 6 nucleótidos por unidad de repetición y la región repetitiva tiende a ser de unos 450 a 500 nucleótidos totales (Butler, 2005). La menor longitud de estos microsatélites conocidos también como STR (Short Tandem Repeat), es muy apropiada para su amplificación por PCR. Por otro lado, los STR tienen la desventaja de mostrar grados de polimorfismo menor en las poblaciones estudiadas al observado para los VNTR.

Para 1995 ya se tiene claro que para una tipificación mediante PCR se necesitaba analizar de 9 a 10 loci de STR contrario a la tipificación mediante RFLP, que solo requería la evaluación de cinco VNTR (Noble, 1995). Pero la técnica misma permitía hacer las pruebas más rápido, pues se podía amplificar múltiples regiones de STR (multiplex) en una misma reacción de PCR (Kimpton, et al., 1993). Los nuevos procedimientos han sido validados por diferentes investigadores en diversas partes del mundo, para las más variadas condiciones de la muestra biológica, tales como degradación, contaminación, concentración de ADN, etc (Finch, J. et al, 1996; Schimtt, C. and Benecke, M. 1997).

Debido a que los fragmentos amplificados de STR eran de menor longitud que los resultantes de las pruebas de VNTR-RFLP, la separación de estos se lleva a cabo mediante electroforesis vertical de poliacrilamida. Esta matriz de separación permite la resolución de fragmentos de ácidos nucleicos de mucho menor tamaño a lo permitido por la agarosa (Inman y Rudin, 1997). Como ventaja adicional, no era necesario el uso de sondas radioactivas simplificando el proceso para la observación de las bandas mediante tinción con plata.

Una labor que hubo que reconfigurar al adoptarse la tipificación de ADN mediante PCR fue el establecimiento de una base de datos conteniendo las frecuencias para los alelos (STR) correspondiente a las diversas poblaciones y subpoblaciones tal y como se había hecho para las pruebas mediante RFLP. Otro aspecto relacionado a las pruebas que se debió actualizar fue la digitalización de los Bancos de Datos de ADN de cada jurisdicción. A partir del “DNA Identification Act” de 1994 el gobierno federal, a través del FBI, proveyó fondos a laboratorios estatales con el fin de establecer facilidades para la recolección, análisis de muestras e integración al Banco de Datos los perfiles de ADN de convictos y de aquellos con causa para arresto (según establezca la ley de cada jurisdicción). Los Bancos de Datos de cada jurisdicción se integran a su vez a un sistema mayor, el “Combined DNA Identification System” (CODIS).

La finalidad del CODIS es permitir un intercambio de información sobre identidad de sujetos entre estados y entre autoridades estatales y federales. También provee acceso a este tipo de información a jurisdicciones internacionales tales como Reino Unido e Interpol, entre otros (Bieber, et al., 2006). Sin embargo, la mayor parte de los laboratorios de estados que fueron evaluados en una encuesta en 1995, estaban retrasados dramáticamente en el análisis de las muestras colectadas. El estudio reveló que de 141,870 muestras colectadas (19 estados), se habían analizado 17,430 solamente (McEwn, 1995). El CODIS no estaba actualizado, ni lo estaba cuatro años después en 1999 según el informe de la comisión nacional para examinar el futuro de la evidencia del ADN que nombró el Instituto Nacional de Justicia de Estados Unidos (Asplen, 1999), ni lo está aún hoy.

Los bancos de datos de ADN es un tópico que ha originado polémicas de índole jurídica, social y ético (Levitt, 2007). Sus beneficios y costos para los derechos humanos y libertades civiles podrían bien ser el tema de un artículo aparte. Urge que los ciudadanos estén informados y comprendan el uso que cada jurisdicción, estado, y nación hace con esta información.

### **Técnicas accesorias de las pruebas de ADN**

Como parte del perfil del ADN se puede determinar el sexo del sujeto al que pertenece una muestra de origen desconocido. Hace ya décadas que se tiene conocimiento que el gen de amelogenina (una proteína de la raíz del diente), está localizado en el cromosoma X y en el Y. Su utilidad para la determinación de sexo es que el gen del cromosoma X es 6 nucleótidos

más corto que el gen localizado en el Y (Saferstein, 2007). Por tanto, luego de una amplificación por PCR, se observará en la electroforesis dos bandas para el gen de amelogenina si es varón (XY) y solamente una banda si es fémina (XX).

Otro tipo de análisis es el del ADN mitocondrial. Este ADN se encuentra en los organelos que sirven de generadores de energía para las células. Se entiende que las mitocondrias que tiene un individuo las heredó de su madre (permite establecer linaje materno). Los investigadores han identificado dos regiones del ADN mitocondrial (hipervariable 1 y 2) en las que se observa un ritmo rápido de mutación (Fig. 5). Estas mutaciones se conservan pues la mitocondria carece de un sistema de revisión y reparación como lo tiene el núcleo de la célula (Stix, 2008). Los antropólogos moleculares han podido seguir las huellas de la migración del hombre moderno al analizar el ADN mitocondrial. Se han identificado marcadores propios de etnias y subpoblaciones en todos los continentes.

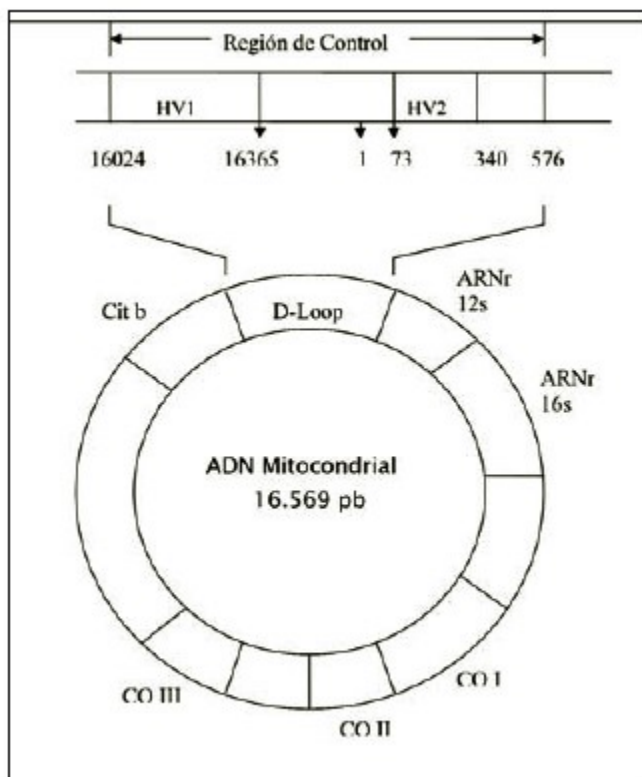


Fig. 5. Mapa genérico del ADN mitocondrial que muestra la posición de las regiones hipervariables HV1 y HV2.

Para las Ciencias Forenses el análisis del ADN mitocondrial ofrece una herramienta de gran utilidad para resolver casos fríos, de desaparecidos, de desconocidos en fosas comunes y de desastres (Owens, et al. 2001; Lorente, et al., 2001; Ladika, 2001). Las variaciones que se observan en las regiones hipervariables pueden ser de uno a dos nucleótidos. Por esa razón, el análisis del ADN mitocondrial, por lo general consiste en secuenciar estas regiones hipervariables, que

se compone de unos cientos de pares de bases de la totalidad de poco más de 16,000 pb del ADN mitocondrial (Inman, y Rudin, 1997).

La secuenciación del ADN se fundamenta en una técnica desarrollada a finales de los 1970,

conocida como el método didesoxi (Sanger, et al., 1977). Requiere llevar a cabo cuatro reacciones de replicación de ADN *in vitro* que contenga cada una, además de los cuatro desoxinucleótidos regulares, algún nucleótido didesoxi que actúe como inhibidor de la reacción. Dado el caso que cada una de las cuatro reacciones contiene un nucleótido inhibidor diferente (sea ddA, ddG, ddC o ddT), entonces la replicación de las cadenas se va deteniendo de forma aleatoria en cada reacción, resultando en un pool de fragmentos de diversos tamaños. Al cargarse los productos de las reacciones en carriles continuos en una gel de poliacrilamida, se obtiene un patrón de bandas que al leerse desde la base, permitía determinar la secuencia del fragmento de ADN de interés (Fig. 6a). Esta técnica era laboriosa además de requerir el uso de isótopos.

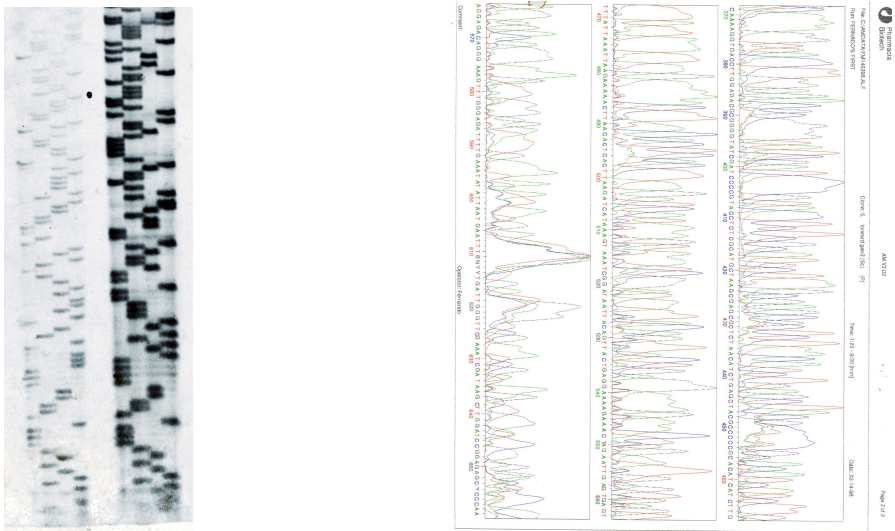


Figura 6. Secuenciación de un gen de ARN de transferencia mediante la técnica de didesoxi, a. Secuenciación mediante el método original en la que se utilizaban nucleótidos marcados con  $^{35}\text{S}$ . b. Secuenciación automatizada en la que se utilizan nucleótidos modificados con fluorescencia. Los resultados son parte de la investigación del autor sobre el genoma de *N. Clavipes*.

Más adelante el procedimiento se automatizó y se sustituyen los nucleótidos radioactivos con ddNTP modificados con tintes fluorescentes, que podían ser detectados por el sistema computarizado, resultando en una gráfica con picos de colores que corresponden a la secuencia de nucleótidos en el fragmento de ADN de interés (Fig.6b ). El proyecto genoma humano integró el uso de la robótica como parte de la automatización de la técnica de secuenciación. Además, el uso de electroforesis de capilaridad para separar los fragmentos de ADN ha disminuido los tiempos del proceso de horas a minutos (Weaver, 2002).



Con la intención de penetrar un mercado que se expande, muchas compañías que diseñan y fabrican materiales para uso de laboratorios de investigación, han producido kits para análisis de hasta 23 loci de STR más el del gen de amelogenina. También, facilitan la purificación y cuantificación del ADN mediante procedimientos automatizados. Una de estas compañías anuncia que la extracción diferencial de ADN (separa ADN de epitelio de vagina del ADN de espermatozoides), se puede lograr eficientemente con su sistema de purificación de ADN automatizado. Entre los muchos productos, se ha desarrollado un kit que permite amplificar 13 marcadores específicos para el cromosoma Y, cuya evaluación es apropiada en aquellos casos de violación en donde hay una cantidad minúscula de ADN del agresor.

### **Nuevas perspectivas en el análisis forense del ADN**

Los avances en la tecnología del ADN relacionados al mejoramiento de la sensibilidad y capacidad de resolución de los instrumentos, así como la automatización y robotización de procesos han estado acompañados de protocolos experimentales e innovadores que en ocasiones se han pretendido implantar para pruebas de ADN de casos criminales sin la debida validación. Algunos de estos procedimientos no se han sometido a una rigurosa evaluación científica, legal y ética.

El análisis de polimorfismo de nucleótido singular (SNP por su acrónimo en inglés) es un buen ejemplo a mencionar. Este tipo de análisis puede ser usado para determinar la genética de características físicas (color de ojos y piel), como también para indagar en la farmacogenética de un individuo, con el fin de asociar secuencias de ADN a variaciones en reacciones a drogas y medicamentos (Morling, 2009). El investigador alemán, Mark Benecke, reconocido mundialmente por su trayectoria como forense, es autor de un ensayo en el que justifica el uso de regiones de ADN codificantes para característica físicas en las pruebas de ADN. Indica el investigador que si se utilizan fotos para identificar criminales, entonces por qué no hacer pruebas sobre ADN codificante (Benecke, 2002).

Otro procedimiento que ha originado críticas por pretenderse su aplicación forense sin los debidos estudios, es el análisis de número bajo de copias (low-copy number analysis). Hay evidencia experimental que mediante este análisis ciertas bandas de ADN que deben observarse no se amplifican (“drop-out effect”), mientras podrían observarse bandas que no corresponden a la muestra (drop-in effect). Aun así las autoridades británicas han querido

utilizar resultados de esta técnica como evidencia en casos criminales. El FBI por su lado lo recomienda aunque solo bajo ciertas circunstancias como para la identificación de osamentas de desconocidos (Gilbert, 2010). Quizás una de las pruebas de ADN más polémicas es la búsqueda de criminales mediante el ADN de sus familiares (Bieber, et al., 2006). Mediante este formato en Estados Unidos se ha llevado a convicción asesinos en serie como Lonnie Franklin conocido como “Grim Sleeper Killer” y a Kevin Rader el notorio asesino BTK (bound, torture, kill), (Miller, 2010). Los juristas se preguntan en relación a este método, si personas que respetan la ley se podrían convertir en blanco de una investigación únicamente por compartir ADN con alguien en la base de datos.

### **Las pruebas de ADN en Puerto Rico**

En Puerto Rico, hacia 1995 ya se muestra la disposición para el uso del ADN como evidencia en casos civiles tal y como se puede evidenciar en el caso 95JTS93, una demanda de la Sra. Rivera Pérez en representación de Hijo v. Los hermanos León. Como parte de los escolios de este caso se muestra una detallada revisión de la literatura y casos relevantes de su momento histórico. Pero no es hasta el 1998 que la legislatura aprueba la ley 175 para establecer el Banco de Datos de ADN de Puerto Rico. Esta ley tiene dos enmiendas, la ley 527 de 2004 y la ley 253 de 2010. La ley 527 de 2004 tiene como objetivo principal añadir una diversidad de delitos para los que debían hacerse las pruebas de ADN luego que un acusado resultara convicto. Para algunos de estos tipos de delitos, el ADN como evidencia sería irrelevante en nuestra jurisdicción, como por ejemplo esclavitud (¿qué tipo de esclavitud?), robo en todas sus modalidades, secuestro, clonación humana y genocidio. La ley 253 de 2010 se establece para que se hagan pruebas de ADN a toda persona contra quien se encuentre causa para arresto por alguno de los delitos en la larga lista. A esto debemos incluir que todo aquel convicto al que se le apruebe pasar a la libre comunidad bajo custodia mínima, compulsoriamente tiene que proveer su muestra de ADN, de no habersele hecho anteriormente. Esto ha dislocado el trabajo de los investigadores y técnicos en Ciencias Forenses. Como prueba del disloque, recientemente se menciona en la prensa el tapón de pruebas por hacer (El Nuevo Día, 29 de enero de 2014), y se menciona en un editorial, que 400 casos prescribieron por no hacerse a tiempo las pruebas de ADN (El Nuevo Día, 30 de enero de 2014). Sin embargo, se ha evidenciado que en Puerto Rico se tiene el manejo para la efectiva utilización de estos procedimientos y técnicas cuando se anunció la identificación del torso de mujer encontrado en

la laguna de Santurce par de meses luego de su hallazgo (El Nuevo Día, 16 de abril de 2014) .

La desarticulación del trabajo forense surge de una situación más compleja que la gran cantidad de evidencia por analizar. El proceso investigativo ha estado fallando desde sus bases, esto es, el proceder con la cadena de custodia diligentemente. Del caso del asesinato del trompetista en el 2003, a las fallas en las recopilación de evidencia en el caso de niño asesinado en Dorado (2010) y la supresión de la evidencia biológica en el caso del asesinato de la bailarina (El Nuevo Día, 11 de febrero de 2014, mas adelante un tribunal de mayor instancia revocó la supresión), se puede establecer claramente que se requiere una reforma en los procesos investigativos en Puerto Rico.

Recursos y capacitación son imperativos para las Ciencias Forenses y la Investigación Criminal. En cuanto a la preparación de profesionales en las diversas especialidades, urge desarrollar programas de justicia criminal de mayor envergadura en las instituciones universitarias del país así también especialidades en áreas forenses para Ciencias Naturales y Sociales en el nivel graduado. Para esto es quizás necesario reclutar especialistas en diversas áreas de las Ciencias Forenses (posiblemente del exterior) que capaciten a los profesionales en las nuevas tecnologías y nuevos procedimientos. Otros se incorporarían como profesores de instituciones universitarias. Todo esto debe estar acompañado de una revisión de salarios para los que se dediquen a profesiones relacionadas con la criminalística. De esta manera se minimizaría la emigración de estos profesionales. Quizás entonces se aumente de forma notable la solución de casos criminales fundamentados en evidencia física y circunstancial.

**Nota de agradecimiento** al señor Jorge Rodríguez-Echegaray por su colaboración en la digitalización, modificación e integración de las figuras que se utilizaron en este artículo y por la revisión de varias secciones de este trabajo.

## **Referencias**

Arroyo-Cruzado, G. (2011) La enseñanza y capacitación en biotecnología desde la perspectiva de la Educación General. *Revista Umbral* 4, 66-78.

Asplen, C, (1999) From crime scene to courtroom: integrating DNA technology into the criminal justice system. *Judicature* 83, 1-7.

Benecke, M. (2002) Coding or non-coding, that is the question. *EMBO reports* 3, 498-502.

- Bernath, V. (2008) El ADN como herramienta para la resolución de procesos judiciales. Pasado, presente y futuro. *Revista Química Viva* 2, 103-112.
- Bieber, F., Brenner, C. y Lazer, D. (2006) Finding criminals through DNA of their relative. *Science* 312, 1315-1316.
- Budowle, B., Giusti, A., Wayne, J., Baechtel, F., Fournay, R., Adams, D. Presley, L., Deadman, H. y Monson, K. (1991) Fixed-Bin analysis for statistical evaluation of continuous distribution of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparison. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 841-855.
- Budowle, B., Allard, M., Wilson, M. y Chakraborty, R. (2003). Forensics and mitochondrial DNA: application, debates, and foundations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4, 119-141.
- Butler, J. (2005) *Forensic DNA typing*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, Burlington, Mass.
- Collins, F., Guyer, M. y Chakravarti, A. (1997) Variations of a theme. Cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278, 1580-1581
- Coleman, H. y Swenson, E. (1994) *DNA in the courtroom, a trial watchers guide*. Genelex Corporation: Seattle, Washington.
- Finch, J., Hope, R., Daal. A. (1996) Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Science and Justice* 36, 93-96.
- Gilbert, N. (2010) DNA's identity crisis. *Nature* 464, 347-348.
- Gill, P., Fereday, L., Morling, N. y Schneider P. (2006) The evolution of DNA databases- recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* 156, 242-244.
- Inmann, K. y Rudin, N. (1997) *An introduction to forensic DNA analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Jeffreys, A., Wilson, V. y Thein S. (1985) Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
- Jeffreys, A. y Pena, S. (1993) Brief introduction to human DNA fingerprinting. En Pena S., Chakraborty, R., Epplen, J. y Jeffreys, A. (Eds) *DNA fingerprint: state of the science*. Basel: Birkhauser Verlag.
- Johnson, G. (1996) *How scientists think*. WCB Publishers, Dubuque, IA.
- Kimpton, C., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E. y Adams, M. (1993) Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 3, 13-22

- Ladika, S., (2001) Laying ghosts to rest in Bosnia. *Science* 293, 1422-1423
- Levitt, M. (2007) Forensic databases: benefits and ethical and social costs *British Medical Bulletin*, 83, 235-248.
- Lorente, J., Entrala, C., Alvarez, C. Arce, B., Heinrichs B., Lorente, M., Carrasco, F., Budowle, B., y Villanueva, E. (2001) Identification of missing persons: The Spanish "Phoenix" program. 43, 267-270.
- Martin, P., Schmitter, H. y Schneider, P. (2001) A brief history of the formation of DNA databases in forensic in forensic science within Europe. *Forensic Sci. Int.* 119, 225-231.
- McEwen, J., (1995) Forensic DNA data banking by state crime laboratorios. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1487-1492.
- Miller, G. (2010) Familial DNA testing scores a win in a serial killer case. *Science* 329, 262.
- Morling, N. (2009) PCR in forensic genetics. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 438-440
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273
- Neufeld, P. y Colman N. (1990) When sciences takes the witness stand. *Scientific American* 262, 46-53.
- Noble, D. (1995) Forensic PCR: primed, amplified, and ready for the court. *Analytical Chem.* 230, 613-615.
- Owen, K., Harvey-Blankenship, M., King, M. (2002) Genomic sequencing in the service of human rights. *Int. J. of Epidemiology* 31, 53-58
- Rivera, R. y Rodriguez, A. (1991) Perfil DNA: consideraciones técnico legales. *Forum* 7, 3-12
- Roberts, L. (1992) Science in court: a culture clash. *Science* 257, 732-736.
- Saferstein, R. *Criminalistics: an introduction to forensic science*. 9th ed. Pearson Prentice Hall, Saddle River, NJ.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Schmitt, C. y Benecke, M. (1997) Five cases of forensic short tandem repeat DNA typing. *Electrophoresis* 18, 690-694

Stix, G., (2008) Traces of a distant past. *Scientific American* 299, 53-63.

Vázquez, E., Arroyo, G., Cajigas, I. y Candelas, G. (2003) Upgraded expression of 5S rRNA precludes the production of fibroin by spider glands. *J. Exp. Zool.* 298A, 128-133.

Walsh, J. (1999) The evolving role of the judiciary in admitting scientific evidence. *Judicature* 83, 140-143.

Watson, J., Tooze J. y Kurtz D. (1983) *Recombinant DNA: a short course*. Freeman and Co., New York City, NY.

Weaver R. (2002) *Molecular Biology*. 2nd Ed. McGraw Hill, New York City, NY.



La Revista Umbral de la Universidad de Puerto Rico Recinto de Río Piedras está publicada bajo la [Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).