



Aplicaciones de la genética molecular en la práctica forense

- Oscar F. Ramos M., MD, PhD, Profesor Asistente, Emilio Yunis T., MD, Profesor Titular: Instituto de Genética, Facultad de medicina, Universidad Nacional de Colombia.
- Juan J. Yunis L., MD: Dana Farber Cancer Institute, Harvard University, Boston, USA.

Desde el desarrollo de las huellas digitales a finales del siglo XIX, la tipificación del ADN por VNTR, representa la innovación más poderosa que se haya desarrollado en las ciencias forenses durante el siglo XX. Con el descubrimiento en 1980 del polimorfismo del ADN en el genoma humano y con la subsecuente demostración de que tal hipervariabilidad está ampliamente distribuida en los humanos, las ciencias forenses han reconocido el enorme potencial que ofrece la tipificación del ADN para la identificación de un individuo a partir de una muestra biológica dejada en la escena del crimen. La utilidad de la tipificación del ADN como herramienta forense recae no sólo en su alto poder de discriminación entre los individuos de una población, sino también porque se pueden utilizar muchos materiales de origen biológico, en diferentes circunstancias, que de otra manera serían inútiles en las pruebas de tipificación tradicional. El debate actual sobre las pruebas de ADN pone de relieve la necesidad de imponer un mayor rigor ante las dificultades que aparecen cuando una tecnología científica bastante compleja se introduce como prueba ante un tribunal de justicia. Se discuten las ventajas y limitaciones sobre el uso del polimorfismo del ADN en la medicina forense. En Colombia se deben establecer criterios nacionales para que las pruebas forenses del ADN sirvan a los intereses de la justicia, bien sea para identificar a un criminal o para absolver a un inocente.

INTRODUCCION

Los hechos a través de la historia reciente nos han demostrado la utilidad de las técnicas científicas en la práctica forense. Todos ellos han pasado por las pruebas de confiabilidad para asegurar, por una parte, un conocimiento racional de su uso y, por otro lado, para conocer sus limitaciones. Es así como se han utilizado diferentes pruebas que van desde las más sencillas como las huellas dactilares, la antropología física (antropometría, el retrato hablado, la reconstrucción física), la prueba de Greiss (o de parafina), los polimorfismos de proteínas (grupos sanguíneos, HLA, proteínas séricas y de glóbulos rojos), hasta los más sofisticados como las pruebas de bandeamiento cromosómico, la histotipificación molecular del HLA y las recientemente descritas, huellas digitales del ADN o fragmentos de restricción polimórfica del ADN (RFLP/VNTR).

El sentido común nos enseña que una prueba forense puede ser aceptada como tal si cumple por lo menos tres condiciones: su teoría científica debe ser completamente válida, sus métodos y técnicas deben ser confiables y reproducibles, y debe demostrarse su utilidad práctica en varios casos concretos. Sin embargo, no siempre los tribunales de justicia se rigen por el sentido común. Un ejemplo de ello ocurre en los tribunales de los Estados Unidos, en donde la aceptación de las pruebas científicas en el campo forense se deben someter a los principios establecidos en el caso Frye vs US en 1923: "El principio científico debe ser demostrable, ampliamente establecido y haber ganado la aceptación general en el campo particular al que éste pertenece". Para muchos el criterio Frye peca por vaguedad. Para otros es demasiado restrictivo, y no se entiende si la aceptación general se refiere a la unanimidad, la mayoría de opinión o al rigor científico (1, 2).

Por definición, una prueba de laboratorio que se utilice como peritazgo científico, en un proceso judicial, debe proponerse descubrir la verdad. Para lograr su objetivo, la justicia nombra tanto a personal científico calificado (peritos), como a evaluadores críticos (jueces, fiscales, jurados y abogados). Sin embargo, existe una amplia disparidad entre los criterios científicos y aquellos judiciales. La comunidad científica, por una parte, vigila la investigación sometiendo las nuevas teorías y descubrimientos a exhaustivas revisiones y continuas verificaciones independientes. Por el contrario, en los tribunales de justicia, tales controles científicos están totalmente ausentes y son, en última instancia, los jurados evaluadores (no idóneos en el campo científico), quienes deben emitir un concepto crítico sobre la competencia de una técnica de uso científico, para resolver un caso forense (1).

Algunas de las pruebas forenses aseguraron su utilidad por mucho tiempo, basadas en su amplia aceptación, a pesar de su conocimiento empírico. Sin embargo, estudios científicos exhaustivos han demos-

trado para muchas de ellas su verdadero valor y utilidad ante la justicia. A pruebas como la denominada de Greiss, muy utilizada en el pasado para determinar la presencia de nitritos o nitratos, se les demostró su carencia de valor cuando otras sustancias distintas a la pólvora (orina, tabaco, ceniza, fertilizantes, etc.), dieron lectura positiva (1).

Más recientemente, el debate sobre las pruebas forenses se ha centrado en dos aplicaciones de la biotecnología: por una parte, los indicadores de proteínas, y por otro lado, la identificación molecular por ADN. Ambas técnicas utilizan métodos de electroforesis en gel con el fin de revelar los denominados polimorfismos o diferencias genéticas en una población de individuos. Estas dos técnicas permiten identificar comparativamente muestras de sangre, semen u otro material biológico, con muestras derivadas de un sospechoso o víctima.

Las pruebas forenses basadas en los polimorfismos proteicos de la población se iniciaron a finales de los años sesenta. Estas técnicas se desarrollaron en un comienzo para el estudio de la genética de poblaciones, se sometieron a pruebas experimentales, sus temas se publicaron científicamente y los resultados obtenidos se comprobaron y validaron por diferentes investigadores bajo condiciones experimentales conocidas. Estas técnicas fueron luego modificadas para propósitos forenses, desconociendo científicamente sus limitaciones en la práctica diaria (cantidad, edad, contaminantes, vida media útil, degradación o conservación bajo condiciones de temperatura, humedad y luz) (1, 3).

Un ejemplo de la situación anteriormente señalada lo constituye la muy conocida prueba multisistema, de amplia aceptación por la justicia de los Estados Unidos. Esta prueba se diseñó para detectar el polimorfismo de tres proteínas en un único procedimiento forense; pretendía deducir la máxima cantidad de información a partir de una muestra pequeña. En 1980, el Laboratorio de Serología del Instituto Municipal de Análisis Clínicos de Nueva York la modificó, añadiéndole un cuarto indicador. La prueba multisistema "cuatro en uno" se introdujo ampliamente como prueba judicial, en el Estado de Nueva York, en 1987. Sin embargo, ese mismo año, el director del Laboratorio Municipal de Análisis Clínicos admitió que tan sólo se había publicado un artículo científico sobre este sistema (1).

Durante el juicio: "El pueblo vs. Seda", en los Estados Unidos, el juez determinó que la prueba multisistema cuatro en uno, no cumplía el criterio Frye de amplia aceptación general por parte de la

comunidad científica y, por lo tanto, no podía aceptarse como prueba forense. De esta manera, se puso en tela de juicio su objetividad en cientos de condenas anteriores (1).

Durante los últimos cinco años se ha ido consolidando el uso del polimorfismo del ADN como prueba forense, aunque su teoría científica se ha venido desarrollando durante los últimos 30 años a propósito del estudio de las enfermedades hereditarias, para identificar genes causantes de enfermedades en las familias portadoras de un trastorno congénito y predecir el riesgo de un individuo cuando se conoce el gen causante. Sus ventajas en la investigación criminal están relacionadas, en primer lugar, con la escasa cantidad de material orgánico encontrado en cada caso, la ausencia de problemas con relación a la vejez por deterioro, y en segundo lugar, su confiabilidad incriminatoria o de identificación que es varias veces mayor que las pruebas de polimorfismos de proteínas (1, 3, 4).

La identificación biológica por ADN se basa en la hipótesis ya comprobada de que el código genético es propio de cada sujeto, y tan exclusivo, como la huella dactilar. Dado que el 99% de los 3.000 millones de pares de bases del ADN humano son idénticos para todos los individuos, los científicos buscaron métodos que les permitieran identificar aquellas escasas regiones variables (polimórficas). Las bases teóricas fundamentales, en la identificación forense por ADN, fueron establecidas en 1980 por Wyman y White con el descubrimiento de los segmentos variables o polimórficos del ADN en el genoma humano (5). Su posible uso como huellas digitales del ADN para aplicación forense fue establecido en 1985 por Jeffreys *et al.*, con la subsecuente demostración de que tal hipervariabilidad del ADN está ampliamente distribuida en los humanos (5, 6).

Estas regiones del ADN altamente polimórficas (regiones minisatélites), se caracterizan porque contienen secuencias de nucleótidos que se repiten en tandem, como los vagones de un tren (VNTR = Variable nucleotide tandem repeats) (7). El número repetitivo de las unidades en tandem varía de una persona a otra; un individuo puede tener quince unidades repetitivas donde otro podría tener un poco más de cien. Estas regiones variables del ADN pueden cortarse en sus límites con el uso de enzimas de restricción, produciendo así los denominados fragmentos de restricción polimórfica o RFLP (restriction fragment length polymorphism) (4).

Como el número de segmentos repetitivos varía entre individuos, así también variará la longitud total de estos segmentos VNTR al ser estudiados en el

laboratorio. El número de unidades repetitivas para un sistema particular puede variar de unos pocos a varios cientos, de tal manera que cualquier *locus* VNTR en el genoma humano puede existir en uno de varios cientos de formas o alelos. La colección de varios VNTR, ubicados en diferentes *loci* (genotipo), permite la posibilidad de varios millones de combinaciones, brindando la posibilidad de distinguir exclusivamente a una persona de otra. Esto significa una gran capacidad para poder excluir a un individuo falsamente acusado, y una muy pequeña probabilidad de que existan dos individuos con patrones de ADN idénticos dentro de una población (1, 4, 7).

En el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia se han realizado estudios familiares sobre los marcadores polimórficos del ADN en algunas etnias indígenas y mestizas, con el fin de caracterizar la estructura genética de las poblaciones colombianas. Con el presente trabajo queremos dar a conocer nuestra experiencia en el campo de la genética

de poblaciones, analizando sus beneficios y discutiendo las limitaciones de esta nueva tecnología.

METODOS

Los métodos moleculares que utilizan la caracterización de los VNTR han sido muy atractivos para propósitos forenses debido a que se pueden extraer cantidades de ADN suficientes, a partir de manchas secas de sangre, muestras escasas de semen, uñas, dientes, huesos o folículos pilosos (4, 6). Además, cantidades mínimas del ADN pueden analizarse si sus secuencias específicas son previamente amplificadas *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: polymerase chain reaction).

Los laboratorios forenses emplean tres técnicas para el análisis del ADN: fragmentos de restricción polimórfica de *locus* único o múltiple, hibridización con sondas y reacción en cadena de la polimerasa (Figura 1). Los segmentos VNTR/RFLP se caracteri-

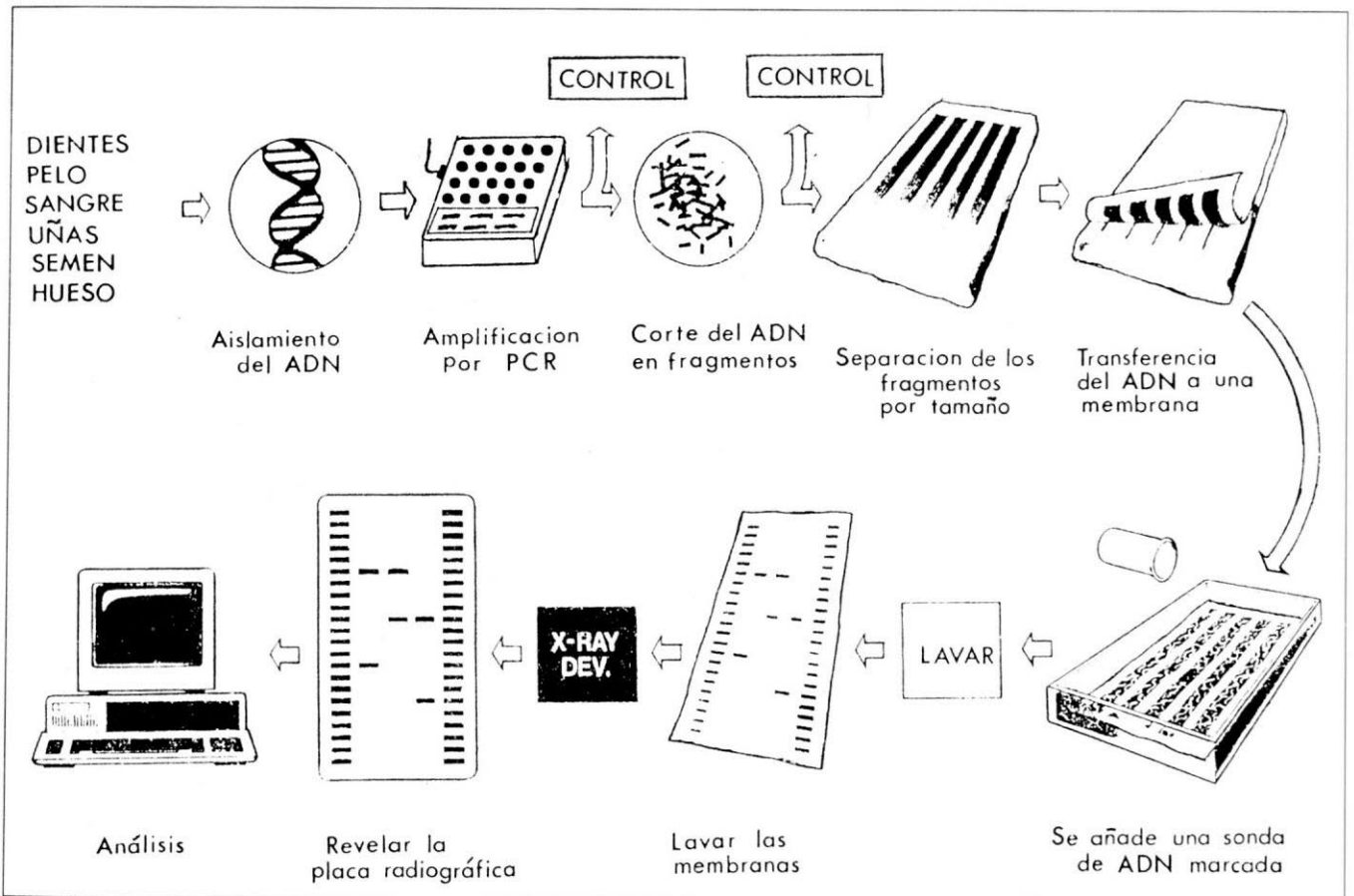


Figura 1. El proceso de identificación forense. Las huellas digitales en el ADN de un individuo sospechoso pueden ser comparadas con las muestras de ADN obtenidas como evidencia. El ADN extraído de la raíz de un pelo es suficiente para iniciar el proceso de identificación forense: aislamiento y purificación del ADN, amplificación por PCR, restricción enzimática, separación de los fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agar, hibridización con sondas específicas de ADN marcadas, revelado, y finalmente análisis comparativo de las muestras.

zan en el laboratorio mediante el uso de sondas que identifican las secuencias específicas de las unidades repetitivas. Una sonda es de *locus* único cuando identifica una secuencia repetitiva, en un solo *locus* (lugar donde se ubica una secuencia específica de ADN dentro de un cromosoma). Si la secuencia repetitiva se ubica en muchos *loci*, se habla de una sonda multilocus (1, 3, 4).

La síntesis de ADN *in vitro* por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser necesaria para incrementar en millones de veces la cantidad de muestra disponible (8, 9). Mediante esta tecnología segmentos de ADN, de cualquier fuente, en cantidades mínimas (10 a 50 nanogramos), y de hasta 3.000 pares de bases en longitud, pueden ser eficientemente amplificados en términos de horas. Para ello se requieren secuencias cortas de ADN que inicien el proceso de síntesis (primers), los nucleótidos a partir de los cuales se sintetiza el ADN, una enzima térmicamente estable que polimeriza el ADN (TAQ) y un aparato reactor de ciclos térmicos (10).

Para la identificación forense por ADN a través del análisis de RFLP, el ADN procedente de distintas fuentes y/o amplificado en el laboratorio es digerido, primero, mediante enzimas de restricción, y luego sus fragmentos así producidos se separan por tamaño mediante el uso de electroforesis en gel (Figura 1). El campo eléctrico empuja los fragmentos de ADN a través del gel de agarosa, avanzando los fragmentos pequeños a mayor velocidad que los grandes. Los fragmentos así separados, por su tamaño, son luego desnaturalizados en hebras individuales y son transferidos del gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa o nylon, la cual fija los fragmentos de ADN en su lugar (1, 4).

Sobre la membrana de nylon o nitrocelulosa se aplica una sonda marcada radiativamente, la cual se enlaza con los fragmentos de ADN al reconocer secuencias específicas dentro de los VNTR (hibridización). Una misma membrana se puede utilizar secuencialmente para hibridaciones con sondas unilocus diferentes. La membrana hibridizada con la sonda radiactiva (de *locus* único o múltiple), se revela sobre una placa de rayos X (autorradiografía). Los fragmentos radiativamente marcados aparecen como una serie de bandas separadas paralelamente (Figuras 1 y 2). La posición de las bandas constituye una medida del tamaño de los fragmentos polimórficos (VNTR). En la autorradiografía resultante, cuando se utiliza una sonda unilocus, se detecta por lo general la presencia de bandas (alelos) de dos tamaños diferentes, uno heredado de cada progenitor (heterocigoto). Si la sonda revela sólo un alelo, se admite que la persona heredó

el alelo del mismo tamaño de ambos padres y será homocigota para dicho *locus* (4).

Para conocer si dos muestras de ADN tienen el mismo origen, se examinan las bandas identificadas por una sonda concreta en la autorradiografía y se comprueba si coinciden o no. Los datos obtenidos se confrontan con aquellos obtenidos en la población general, con el fin de averiguar la frecuencia de aparición del alelo particular. Un alelo típico puede encontrarse en un 10% de la población, por lo que no sería difícil que dos personas escogidas al azar portaran el mismo alelo. Pero si consideramos los alelos de tres o más *loci* distintos, en una misma muestra, disminuye la posibilidad de que dos personas porten los mismos alelos dentro de una población de individuos (a excepción de los gemelos idénticos), y ésta

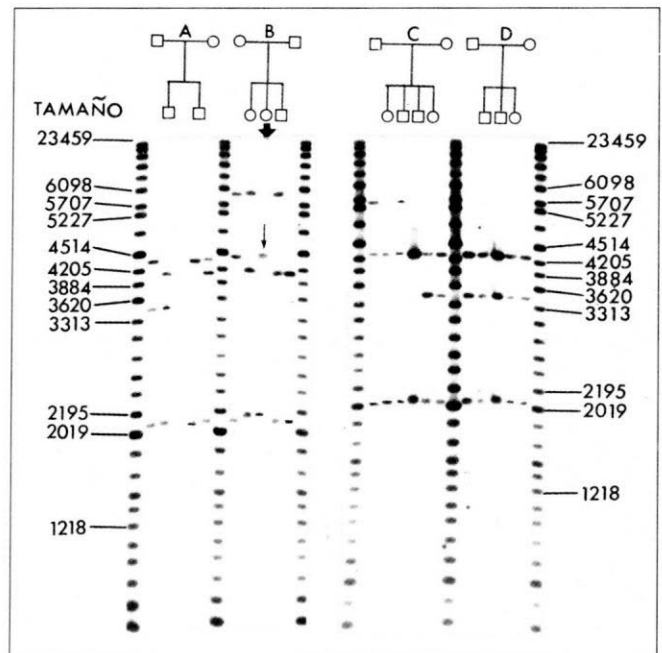


Figura 2. Análisis del polimorfismo VNTR/RFLP en cuatro familias indígenas colombianas. El ADN obtenido de sangre venosa fue digerido enzimáticamente con *Hae*-III; sus fragmentos fueron separados electroforéticamente (24 voltios durante 17 horas) por tamaño en geles de agarosa al 1.0% y luego transferidos a una membrana de nylon (Southern blot). El polimorfismo VNTR para el cromosoma 17 fue analizado con la sonda D17S79 marcada con quemoluminiscencia (Lifecodes Corporation, Valhalla, New York, USA). Se presentan los resultados obtenidos sobre dos familias de la etnia arhuaco (A y B) y dos familias de la etnia yucoyukpa (C y D). Los marcadores VNTR se heredan de padres a hijos de una manera mendeliana codominante. Las flechas sobre la familia arhuaco B indican la presencia de un individuo femenino a quien se le excluye la paternidad. Se indica el tamaño de los fragmentos marcadores de ADN en pares de bases. En las cuatro familias se observa la presencia común de un fragmento VNTR (entre los marcadores 2195-2019) que no es útil para propósitos forenses. En los árboles familiares se indican aquellos individuos de sexo masculino (□) y femenino (○).

es la característica que le otorga al ADN su poder de identidad (1, 3, 4).

Utilizando la metodología anteriormente descrita, se presentan algunos de los resultados obtenidos en las etnias indígenas arhuaco y yucos, de la Sierra Nevada de Santa Marta. En esta población se analizaron individuos por grupos familiares, con el fin de poder caracterizar los alelos y sus frecuencias génicas (Figura 2).

LIMITACIONES ACTUALES

A pesar de que la tecnología empleada es bastante conocida, es la misma comunidad científica quien ha cuestionado la utilidad inmediata del ADN como prueba de identificación absoluta en los tribunales judiciales (1, 3, 11-13). Hasta el momento, se desconocen los márgenes de confiabilidad y error de las técnicas de laboratorio utilizadas; tampoco se han cuantificado las frecuencias de sus marcadores biológicos en los diferentes grupos étnicos y raciales mayores, y tampoco se han precisado los métodos estadísticos que permitan definir su grado de confiabilidad (1, 3, 11-13). Sin embargo, a pesar del cuestionamiento científico, la prueba de ADN se ha utilizado para resolver varios cientos de casos criminales en los Estados Unidos, siendo muy pocas las circunstancias en que dicha prueba ha sido cuestionada (3, 14).

Con la experiencia actual reunida en los diferentes laboratorios forenses que hacen tipificaciones del ADN para resolver casos criminales, se ha podido determinar que (13): aproximadamente el 35% de los casos corresponden a pruebas de exclusión, es decir, aquellos casos en donde se demuestra que no hay identidad entre las muestras biológicas confrontadas; aproximadamente un 20% de los casos no se pueden resolver debido a la muy escasa cantidad de ADN y a otros problemas técnicos. El problema actual está relacionado con un 45% de los casos criminales en los cuales el patrón de VNTR/RFLP en el ADN es idéntico con aquel otro patrón encontrado en la muestra forense. ¿Cuál es la probabilidad de que las dos muestras comparativamente idénticas provengan de la misma fuente?

Cuando se usa el ADN para propósitos forenses, bien sea para la identificación o para la exclusión, surgen de inmediato varios interrogantes: ¿Hasta qué punto una prueba comparativa del ADN representa un error técnico de laboratorio, o hasta qué punto representa una característica de identidad biológica particular? ¿Qué tan frecuente es este carácter "biológico particular" de un individuo dentro de la población?. ¿Cuál es la probabilidad de que tal parámetro de identidad ocurra por casualidad y que el sospe-

choso no tenga nada que ver con la muestra biológica? ¿Existe alguna probabilidad de que otro individuo, dentro de una población particular, muestre el mismo patrón de ADN que la muestra forense?

Problemas técnicos. El poder de identificación forense por ADN radica, por una parte, en la hipótesis de que los RFLP/VNTR producen tantos alelos diferentes que virtualmente forman una serie continua, y por otro lado, en su capacidad para demostrar que dos muestras tienen el mismo patrón biológico. Sin embargo, en la tipificación forense por ADN, es difícil determinar si un alelo de una muestra es idéntico a otro alelo extraído de una muestra distinta (3). En algunos casos, dependiendo del tipo de *locus* examinado, los alelos más comunes pueden reunirse dentro de un intervalo de seis milímetros en un gel de agar de 33 centímetros de longitud. De esta manera, dado que los tamaños de los fragmentos RFLP están espaciados a muy corta distancia, es difícil determinar si la posición relativa de las bandas se debe exclusivamente al tamaño propio de los fragmentos del alelo en cuestión, o si interviene más bien un factor de error en la técnica de electroforesis utilizada (desplazamiento de bandas) (1, 3, 11-13).

También se debe tener en cuenta que aquellos alelos que difieren en una cantidad mínima de unidades repetitivas no se pueden separar por los métodos convencionales de laboratorio. Por ejemplo, es prácticamente imposible diferenciar RFLP de 2.000 pares de bases de aquellos con 2.005 o con 2.020 (3).

Se acepta pues, por parte de la comunidad científica, la existencia del desplazamiento de bandas; algunos expertos consideran que ese desplazamiento se produce en por lo menos el 30% de las pruebas forenses del ADN. Hay varias teorías sobre su causa, pero no se ha publicado ningún artículo científico de verificación. El desplazamiento de bandas en la práctica judicial constituye una excelente ilustración de los problemas que ya han surgido, y los tribunales deben determinar la confiabilidad de un método que no ha tenido el debido proceso de comprobación científica.

Los patrones de bandeamiento originados por los VNTR inducen problemas técnicos de identificación y discriminación de alelos y de reproducibilidad misma de las pruebas. Como método para controlar el desplazamiento de bandas se ha propuesto el uso de sondas especiales dirigidas a *loci* monomórficos, de los cuales se generan fragmentos RFLP del mismo tamaño en una población de individuos. En teoría, si los RFLP monomórficos están desplazados, se habrá

producido un factor delta de desplazamiento, que debe ser calculado y corregido. Sin embargo, ya se ha demostrado que diferentes sondas monomórficas presentan factores diferentes de corrección (1, 3). También se ha propuesto el uso de experimentos mixtos: la muestra A procede por la pista uno en un gel, la muestra B por la pista dos, y la mezcla de las muestras A y B por la pista tres. De esta manera, a pesar de que hay desplazamiento de bandas, se mantiene su identidad (1).

También se ha propuesto que los fragmentos VNTR del ADN se deben agrupar por tamaño; los límites de cada banda estarían determinados por la medida de su error estándar o de desplazamiento (11). Para algunos VNTR es probable que numerosos alelos de tamaño similar sean agrupados dentro del mismo grupo. Es necesario, de manera arbitraria, determinar el tamaño de bandas dentro de un límite de agrupamiento, de acuerdo con su error estándar, y poder predecir así su identidad (14). Dos bandas de VNTR/RFLP asignadas al mismo grupo pueden contener números diferentes de unidades repetitivas.

El FBI de Estados Unidos ha propuesto el uso de las desviaciones estándar: un fragmento RFLP de longitud X corregido con un margen de error delta ($x \pm d$). El FBI usa un valor delta empíricamente establecido del 2.5%, mientras que la compañía Life Codes utiliza un delta del 1.8% (3). De esta manera, dos fragmentos RFLP de ADN, son idénticos en longitud, cuando se superponen sus márgenes específicos de confiabilidad (3).

La contaminación. Esto se refiere a que con mucha frecuencia las muestras biológicas recuperadas en la escena del crimen están deterioradas y contaminadas con micro-organismos u otro material orgánico, que aumentan el riesgo de falsos positivos o negativos. La contaminación puede degradar y destruir los fragmentos RFLP, y así se puede encontrar en una muestra un número inferior de bandas al que normalmente debería verse (1). Además, se debe tener en cuenta que la contaminación del ADN con otras sustancias químicas puede alterar su movilidad electroforética en un gel. De esta manera, aunque las muestras provengan de la misma persona, si una de ellas está contaminada, se pueden originar patrones de bandeamiento comparativamente diferentes.

El análisis estadístico y la estructura genética de las poblaciones. La seguridad y poder de identificación forense por ADN radica en su capacidad no sólo para demostrar que dos muestras tienen el mismo patrón biológico, sino también para sugerir que el patrón genético observado es rarísimo y único

dentro de una población de individuos. Los anuncios hechos por diferentes compañías comerciales en los cuales se proclamaba que el poder de identificación y resolución de las pruebas forenses podría ser hasta de 1:738.000.000.000.000, desataron las mayores controversias entre la comunidad científica (11-15). El problema de la significancia estadística de identidad plantea los siguientes interrogantes: ¿Cuál es la población de referencia de la cual se ha tomado un individuo al azar? ¿Cómo se deben combinar los datos de los diferentes *loci* para dar una probabilidad de identidad única a partir del patrón VNTR del ADN?

Las ecuaciones estadísticas para calcular las frecuencias de un patrón de alelos son útiles solamente cuando se aplican a una población con apareamientos maritales aleatorios, una condición conocida como equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Bajo las condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg, la presencia de un alelo dentro de una población es totalmente independiente de la presencia de un segundo alelo. Gracias a ello se puede calcular la frecuencia de un par particular de alelos (genotipo) para un *locus* específico, dentro de una población (3, 13, 16).

También se puede calcular la frecuencia de un genotipo para una combinación de *loci*, multiplicando la frecuencia del genotipo para cada *locus* individual; matemáticamente hablando: $\Pi_i p_{ij}$, donde j representa un índice de alelos ... j con una frecuencia p_{ij} en una población I . Por ejemplo, si los genotipos A/a , B/b , C/c , D/d en los *loci* A , B , C y D aparecen en un 10% de la población, entonces la probabilidad de que una persona presente estos genotipos en los cuatro *loci* es $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \times 0.1 = 0.0001$ o sea un 0.01% (16, 17). Esto también significa que entre mayor sea el número de *locus* independientes analizados, y mayor sea el número de alelos por *locus*, mayores serán las probabilidades de identificación exclusivas para un individuo. Sin embargo, la adición de varios *loci* a una prueba incrementa sus costos, aunque su capacidad de identificación dentro de una población se acerca a casi 0. Cuando las poblaciones de individuos no se encuentran en equilibrio H-W, ni los alelos, ni los distintos *loci* serían independientes unos de otros. Bajo estas condiciones no existe un método estadístico para calcular la frecuencia de un genotipo particular dentro de una población (3, 12, 13).

A pesar de que el teorema de Hardy-Weinberg es claro, existen controversias con relación a la estructura misma de la población, pues se sabe que, dentro de una población general de individuos existen subpoblaciones, y a veces puede encontrarse que

un sistema polimórfico de un *locus* particular puede estar en equilibrio H-W dentro de la población general, pero no dentro de una subpoblación particular. En términos matemáticos, el producto de los promedios no es lo mismo que el promedio de los productos (3, 13). Esto quiere decir que la identidad de una persona particular puede requerir un grupo humano específico de referencia, compuesto por subpoblaciones étnicas y geográficas adecuadas (3, 11-13, 18).

Las denominadas poblaciones negras, caucásicas, orientales o hispanas, están constituidas por múltiples subpoblaciones con diversas características genéticas. Se conoce además que las diferentes poblaciones humanas son endógamas por naturaleza y esto puede generar un desequilibrio H-W. Esta endogamia está determinada por las características mismas de la población y está relacionada con su etnicidad, ubicación geográfica, nacionalidad y apareamiento marital, bien sea por creencias religiosas, idioma o afinidad socio-cultural (3, 13, 19).

Para un alelo o *locus* que se encuentre en desequilibrio H-W dentro de una subpoblación, la lógica sugiere su eliminación de la base de datos. Sin embargo, esto disminuiría la cantidad de alelos o *locus* útiles dentro de una subpoblación. Para solucionar este problema, el National Research Council (NCR) de los Estados Unidos ha propuesto la determinación de la estructura genética en grupos étnicos mayores como europeos, orientales, negros, hispanos, etc., a los cuales se deba referir el caso índice observado dentro de una subpoblación específica. Bajo estas condiciones, el cálculo de la frecuencia de un genotipo particular, dentro de una subpoblación, estaría mejor definido por aquellas frecuencias observadas en el grupo étnico mayor (siempre y cuando cumpla la condición de equilibrio H-W). Es decir, se trabajaría con las frecuencias promedio p_i de una población mayor, dentro de la cual la subpoblación I se presume que es un componente (3).

Si el producto $\prod_j p_{ij}$ del grupo étnico mayor resultara menor que el producto $\prod_j p_{ij}$ observado en la subpoblación I, habrá desde luego una subestimación perjudicial para el inculpatado. Para solucionar este problema, el NCR de los Estados Unidos ha sugerido el uso de las frecuencias génicas representativas de los grupos raciales mayores puros, en donde se presume que el valor de las frecuencias se encuentra en sus límites máximos ("ceiling principle"); o sea, $\prod_j \max_i(p_{ij})$. Para implementar este principio el NCR sugiere el muestreo de por lo menos 100 individuos pertenecientes a 15 o 20 poblaciones mayores genéticamente "puras y homogéneas" (3, 11-13).

La evaluación de una probabilidad estadística de identidad debe tomar en cuenta una población de referencia de la cual se deriva la muestra forense. Sin embargo, aquí surge otro problema puesto que, aun cuando se tenga pleno conocimiento de la estructura genética de las subpoblaciones de referencia, es muy difícil predecir, a priori, el grupo humano al cual se deban referir las muestras forenses dejadas por un sujeto desconocido en la escena del crimen. Por ejemplo, no se comprendería bien cómo elegir un grupo poblacional de referencia para una muestra biológica dejada por un criminal desconocido en la ciudad de Nueva York, en donde los grupos étnicos mayores comprenden negros, japoneses, hispanos, chinos, europeos, vietnamitas, etc. La composición racial de un criminal desconocido se podría determinar teóricamente por los datos que aporte un testigo. Por lo tanto, la población de referencia para uso estadístico de identidad es totalmente teórica, y probablemente, compuesta por un grupo humano con algún grado de mestizaje (1, 3, 11-13).

La manera correcta de estimar las probabilidades reales consiste en determinar las probabilidades alélicas de cada subgrupo racial particular, pero los datos sobre la estructura genética de cada subgrupo no existen, y tomaría varios años conseguirlos. Además, la subestructuración genética dentro de las poblaciones tiene varias consecuencias: no existe un grupo poblacional homogéneo de referencia para poder estimar la frecuencia de un prototipo particular de ADN; por lo tanto, un individuo como caso forense, puede requerir diferentes grupos poblacionales de referencia. Otra consecuencia es que la ley de la multiplicación de las frecuencias génicas de los diferentes *loci* no es la mejor, ya que se requiere de un estimativo real para cada subgrupo poblacional (3, 13).

RECOMENDACIONES PARA COLOMBIA

La identificación forense de individuos a través de las denominadas huellas digitales del ADN requiere de la participación de dos campos especializados de la biología como son la genética molecular y la genética de poblaciones. En el Instituto de Genética, de la Universidad Nacional de Colombia, se han adelantado diferentes trabajos de investigación en el campo de la biología molecular, con el fin de caracterizar la presencia de alelos polimórficos del ADN en las poblaciones indígenas y mestizas colombianas (20-22). También se han desarrollado diferentes trabajos de investigación a nivel poblacional, con el fin de conocer tanto la estructura genética como nuestra composición racial en términos de mestizaje. Con dichos estudios pretendemos identificar si la población general o sus distintas subpoblaciones, cumplen con los requisitos míni-

mos necesarios para los análisis estadísticos, bien sea aplicables en las pruebas de paternidad o en la identificación forense de individuos (23-26).

Los estudios de polimorfismo genético utilizando ocho sistemas sanguíneos sobre una muestra de 65.235 individuos clasificados por regiones naturales y por la distribución político-administrativa, indican que

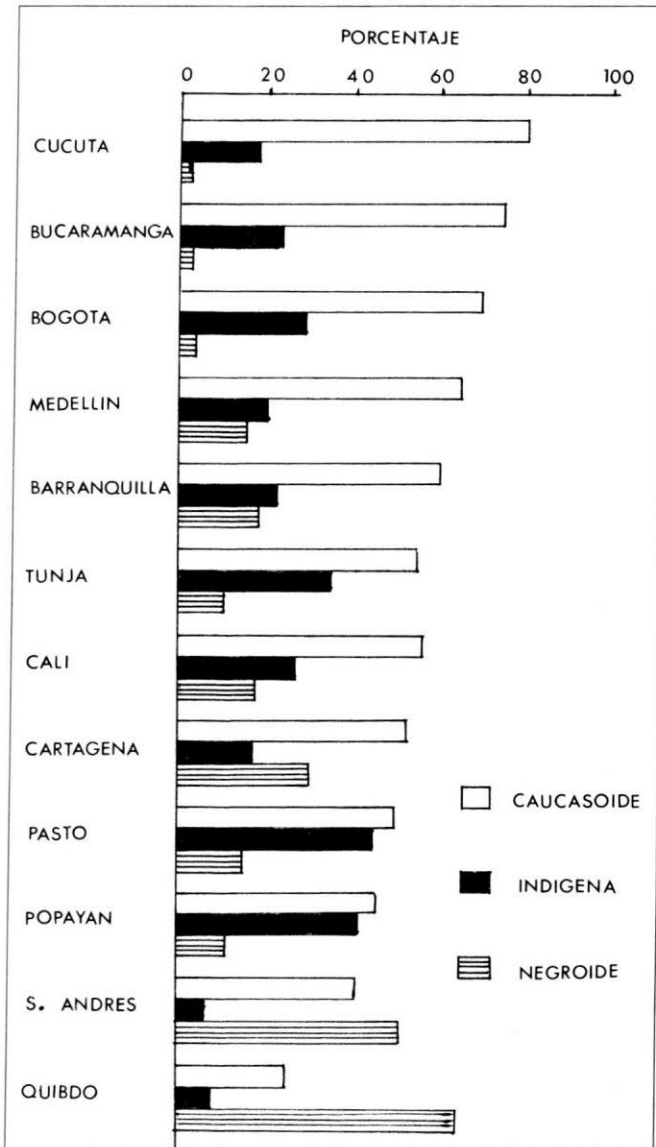


Figura 3. Heterogeneidad racial en la población colombiana. Se muestran los tres componentes de mezcla tri-étnica (indígena, caucasoide y negroide) para algunas ciudades capitales. Se estudiaron 60.235 individuos a nivel nacional. Las proporciones de mezcla étnica para el país en general son: 66.66% de caucasoide, 22.38% de indígena y 11.96% de componente negroide. Cúcuta y Bucaramanga presentan el mayor contenido racial caucasoide (70 - 80%). Pasto, Popayán y Tunja presentan el mayor contenido racial indígena (40 - 46%). San Andrés y Quibdó presentan el mayor contenido racial negroide (51 - 67%). Datos tomados de López, ND. (25).

la población colombiana general, a diferencia de la población europea, es totalmente heterogénea en su estructura genética, tanto por efecto de las continuas migraciones poblacionales como por efecto de los apareamientos maritales no aleatorios (23-26). Además, aunque el grueso de la población colombiana es caucasoide (65.66%), las proporciones de cada elemento racial (europeo, negroide o indígena) presenta amplios rangos de variación según la ubicación geográfica, y según sus antecedentes histórico-culturales, que determinaron sus migraciones (Figura 3) (23-25).

Los resultados sobre la estructura genética y composición racial indican que nuestra población colombiana general no cumple ni con las condiciones poblacionales de aleatoriedad (población panmítica) necesarias para los análisis estadísticos de identificación forense, ni con las condiciones de homogeneidad racial. Estos hechos obligan a un análisis genético subpoblacional específico para cada una de las regiones, departamentos, ciudades o municipios, lo que tomaría varios años. Bajo las condiciones actuales es absolutamente imposible calcular, para la población general, tanto los índices de paternidad como los índices de identificación forense. Es decir, los marcadores polimórficos, tal como se encuentran definidos hoy día en nuestra población, sólo sirven como elementos de exclusión (23-25).

En 25 familias de la *etnia* Coyaima (Tolima) se estudiaron varios marcadores VNTR pertenecientes a los *loci* D2S44, D14S13 y D17S79 (20-22). Las frecuencias específicas de los alelos allí caracterizados fueron comparados con aquellos datos obtenidos en los europeos, negros e hispanos de Norte América, e indican que no existen diferencias significativas a nivel poblacional. Es decir, dichos marcadores VNTR son genéricos a dichos grupos raciales, y muy seguramente tienen escaso valor poblacional. Ello nos indica que se deben hacer muestreos poblacionales a fin de poder identificar aquellos marcadores VNTR específicos a grupos raciales o étnicos para propósitos forenses (20).

Teniendo en cuenta que la población colombiana es genéticamente heterogénea, y que los estudios subpoblacionales tomarían varios años, se recomendaría hacer primero una base de datos con los marcadores genéticos de aquellas poblaciones en necesidad urgente para su identificación, como serían las poblaciones carcelarias y las poblaciones al servicio de la justicia nacional (policía, ejército y servicios de inteligencia), de la misma manera que lo ha hecho el FBI de los Estados Unidos.

Consideramos que los estudios genéticos poblacionales, y la revisión constante de los métodos moleculares

forenses, son la única manera de asegurar una adecuada justicia. Es absolutamente necesario el establecimiento de criterios nacionales y científicos antes de que una prueba pase del laboratorio a la sala de justicia. Además, se deben incluir leyes que aseguren el cumplimiento de esos criterios. También es claro que la justicia podrá valorar objetivamente las pruebas forenses

cuando los jueces, abogados y fiscales, estén debidamente capacitados para poder ponderar los aspectos científicos en cuestión, y no sólo se limiten a revisar los créditos académicos de los expertos peritos. La justicia no se debe limitar simplemente a admitir el testimonio de un experto científico como prueba, y en delegar al jurado la determinación de su valor.

REFERENCIAS

1. Neufeld, P. Colman N. La ciencia al servicio de la justicia. *Sci Am* 1990; 262: 46-53.
2. Melson KE. Legal and ethical considerations. In: *DNA fingerprinting*. Kirby LT. ed New York Stockton Press, 1991: 189-215.
3. Weir BS. Population genetics in the forensic DNA debate. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:11654-11659.
4. Kirby LT. *DNA fingerprinting*. New York: Stockton Press, 1990.
5. Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6754-6758.
6. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-72.
7. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235: 1616-1622.
8. Li H, Gyllesten UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*. 1988; 335: 414-417.
9. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HA ed. *PCR technology principles and applications for DNA amplification*, New York: Stockton Press, 1990: 31-43.
10. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-65.
11. Lander S. DNA fingerprinting on trial. *Nature* 1989; 339: 501-505.
12. Chakraborty R, Kidd K. The utility of DNA typing in forensic work. *Science* 1991, 254: 1735-1739.
13. Lewontin RC, Hartl DL. Population genetics in forensic DNA typing. *Science* 1991, 254: 1745-1750.
14. Budowle B, Giusti AM, Wayne JS, Baechtel FS, Fourney RM, et al. Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distribution of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 841.
15. Roberts L. Fight erupts over DNA fingerprinting. *Science* 1991, 254: 1721-1723.
16. Risch NJ, Devlin B. On the probability of matching DNA fingerprints. *Science* 1992; 255: 717-720.
17. Evett, IW. Trivial error. *Nature* 1991, 354: 114.
18. Weir, BS, Evett, IW. Whose DNA ?. *Am J Hum Genet* 1992; 50(4): 869.
19. Levi-Strauss C. *Las estructuras elementales del parentesco*. 1a edición traducida al español. Barcelona: Planeta-agostini, 1985.
20. Lewandrowski EL, Williamson JM, Bing DH, Yunis JJ, Yunis EJ. Genetics of VNTR markers in South amerindians: Analysis of the D2S44, D14S13 and D17S79 loci in the pijao tribe from the Tolima Department of Colombia, South America. In: *Proceedings of The second international symposium of human identification* Promega corporation, 1991: 325-330.
21. Bing DH, Yunis, EJ, Yunis EJ. The use of genetic markers in the analysis of the antropological origins of the South amerindians. In: Promega corporation, editor. *Proceedings of the Third International symposium on human identification* 1992.
22. Bing DH, Williamson J, Lewandrowski EL, Yunis JJ, Delgado MB, Yunis, EJ, Ramos O, Yunis E. Analysis of blood groups and VNTR markers in two colombian indian tribes. In: Promega corporation, editor. *Proceedings of the Third international symposium on human identification* 1992: 231-243.
23. Sandoval CE. *Estructura genética de la población colombiana (Tesis de grado)*. Bogotá, D.C.: Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, 1993.
24. Sandoval CE, De la Hoz, A, Yunis E. *Estructura genética de la población colombiana: análisis del mestizaje*. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*. 1993; 41: 3-14.
25. López ND. *Estructura genética para la población colombiana. Segunda muestra: 29.982 individuos. Análisis de la muestra total de 65.235 individuos. Distribución en ciudades capitales. Frecuencias génicas y de mestizaje por sectores en el centro del país (Tesis de grado)*. Bogotá, D.C.: Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. 1993.
26. Ossa Reyes H. *Estudios genéticos en las comunidades indígenas del nor-orienté colombiano (Tesis de grado)*. Bogotá, D.C.: Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. 1993.