

Avances moleculares en Medicina Legal

Angel Carracedo

Instituto de Medicina Legal.

Universidad de Santiago de Compostela

1. Introducción

El descubrimiento del polimorfismo del ADN minisatélite (1) ha sido, sin duda, el hallazgo que más impacto ha tenido nunca en la Biología Forense, especialidad médico-legal que se ocupa de la resolución de problemas jurídicos por medio de la aplicación de conocimientos de antropología y de genética molecular, y en la que se realizan dos tipos básicos de pericias relativas a la investigación biológica de la paternidad y de criminalística biológica. La capacidad de identificación de estos polimorfismos es de tal magnitud que han sido calificados de “huella genética” (2).

En este trabajo analizaremos sucesivamente la naturaleza del polimorfismo del ADN y la metodología de análisis de polimorfismos hipervariables de ADN para acabar comentando las aplicaciones médico-legales de estos polimorfismos.

El ADN expresivo o codificante es, en general, poco polimórfico, con la excepción de la región HLA. Desde el punto de vista médico-legal es, por ello, mucho más interesante el ADN no expresivo que cuantitativamente supone la mayor parte del genoma humano.

Aproximadamente la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo y sus clases se pueden ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Clases de ADN repetitivo en el genoma humano

-
1. Repetido en tándem (10% genoma):
 - Satélites clásicos (Sat I-IV, secuencia alfoide)
 - Minisatélites
 - Microsatélites
 2. Repetitivo disperso (15% genoma)
 - LINES (>500bp: Familias L1 o Kpn)
 - SINES (<500bp: Familia Alu)
-

Aunque gran parte del repetitivo es extremadamente polimórfico, por diversos motivos, el ADN repetitivo más interesante desde el punto de vista médico-legal es el ADN repetido en tándem y, dentro de él, el ADN minisatélite y microsatélite.

En 1984, Weller y col. (3) describen una región de ADN situada en uno de los intrones del gen de la mioglobina humana, formada por cuatro repeticiones en tándem de una secuencia de 33 pares de bases (bp). Esta secuencia de 33 bp mostraba una cierta similitud con la secuencia de otros loci hipervariables descritos. En 1985, Jeffreys y col. (1), basándose en que la región hipervariable de la mioglobina estaba flanqueada por una repetición directa de 9 bp característica de la duplicación de secuencias blanco generada por elementos transponibles, sugirieron que algunas regiones hipervariables podían estar relacionadas por transposición. Posteriores experimentos no confirmaron esta hipótesis, pero se pudo observar que la homología parcial existente entre las secuencias de varias regiones hipervariables daba lugar, hibridando en condiciones poco rigurosas la secuencia de 33 bp con ADN genómico, a la aparición de un complejo patrón de bandas para cada individuo. Jeffreys y col. (2) consideraron que estos patrones serían prácticamente específicos para cada individuo, y los denominaron "DNA fingerprints" (huellas genéticas). Las bandas que apare-

cen en un patrón de "DNA fingerprint" corresponden a distintos loci, hipervariables o no, con secuencias relacionadas entre sí.

Trabajando sobre el fenómeno de la homología parcial, Nakamura et al (4) en 1987, realizaron un estudio sistemático utilizando oligonucleótidos con las secuencias conocidas de varios loci hipervariables como sondas para analizar una librería genómica humana. Una vez hubieron seleccionado los clones positivos (que hibridaban con alguno de los oligonucleótidos), usaron estos clones como sondas en un análisis por RFLP (restriction fragment length polymorphism-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) en individuos elegidos al azar. De esta manera, el grupo de Nakamura fue capaz de caracterizar unos 200 loci hipervariables. El polimorfismo exhibido por la mayor parte de estos loci es un polimorfismo debido a cambios en el número de veces que era repetida una secuencia "núcleo"; por ello, denominaron a tales loci como loci VNTR ("variable number of tandem repeats), número variable de repeticiones en tándem.

Las bases moleculares de un polimorfismo VNTR pueden verse en la Fig. 1.

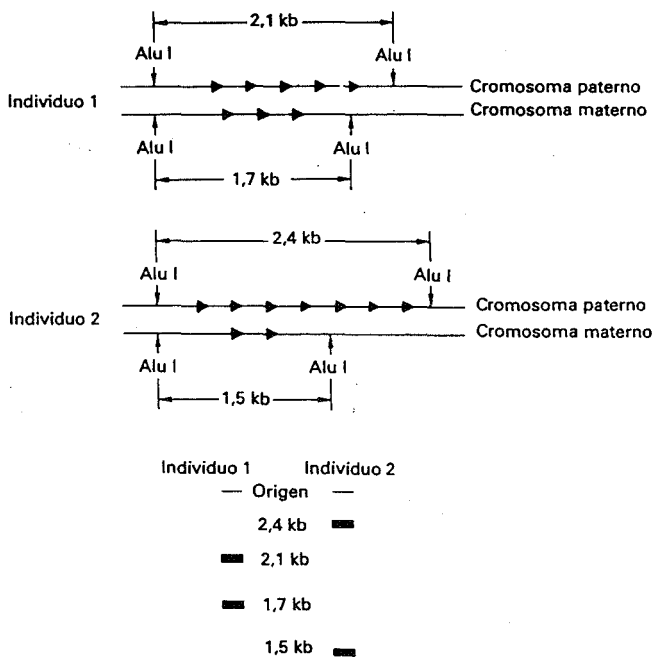


Fig. 1: Bases moleculares de un polimorfismo VNTR. El número de repeticiones de la secuencia varía enormemente originando individuos casi siempre heterocigotos con fragmentos de un tamaño que depende del número de repeticiones. La herencia de los alelos es siempre codominante.

2. Análisis de VNTRs mediante sondas de locus único (“single-locus”, SLPs).

Aunque en un primer momento de su aplicación forense los minisatélites se analizaban tal como indicábamos anteriormente con sondas multi-locus, pronto se limitó mucho su uso por la imposibilidad de construir bases de datos comunes, dificultad de estandarización y por los problemas bioestadísticos de evaluación de los resultados.

Incluso con sondas “single-locus” (SLPs) que, con condiciones rigurosas de hibridación, reconocen locus VNTR únicos, se presentaron problemas en los primeros momentos de su uso, que motivaron sentencias de gran resonancia como el caso Castro en la jurisprudencia norteamericana.

Existían realmente en estos primeros momentos del uso de esta tecnología con fines forenses, numerosos problemas sin resolver que tenían que ser solucionados antes de que pudiese ser utilizada con seguridad en casos legales.

En Norteamérica este reto fue afrontado por la TWGDAM (Technical work group for DNA analysis methods) y en Europa simultáneamente por la EDNAP (European DNA profiling group), grupo que reunía a los 10 laboratorios forenses o de la policía que, en 1987, trabajábamos con polimorfismos ADN. Posteriormente el grupo fue ampliado a un representante más por cada país europeo no representado en el grupo original.

Obviamente el primer reto era uniformizar los enzimas de restricción a utilizar y las sondas. En 1988 existían ya decenas de polimorfismos VNTR hipervariables, con patrones distintos para cada enzima. Si cada laboratorio utilizase sondas o enzimas distintos no se podrían nunca utilizar bases de datos comunes ni uniformizar los resultados y se imposibilitaba una necesidad médico-legal básica: la posibilidad de contrapericia, esto es, de un contra-análisis en otro centro.

Mientras que en Norteamérica se popularizó el uso de Hae III y Pst I, en Europa la EDNAP aprobó el uso de Hinfl.

A pesar de que la estandarización entre TWGDAM y EDNAP fue imposible desde entonces, en Europa al menos se uniformizó rápidamente el uso de las mismas sondas (MS43a, YNH24, MS31 entre otras), el mismo protocolo electroforético (5) e incluso los métodos de lectura y de asignación de tamaño de bandas, el control de ADN genómico a utilizar y el tipo de “ladder”.

Persisten todavía problemas sobre estimas de frecuencias y de evaluación de los resultados aunque el uso de aproximaciones puramente bayesianas a estos problemas va teniendo cada vez mayor aceptación.

Desde que se logró la estandarización en los aspectos más esenciales el uso de las SLPs para detectar polimorfismos VNTR con fines médico-legales fue perfectamente válido aunque para cada población fue necesario hacer la estima de las frecuencias alélicas, lo que en España fue realizado para las sondas más comunes en 1991 (6,7). Un ejemplo de estimas de frecuencias para SLPs más avanzado puede verse en la Fig.2.

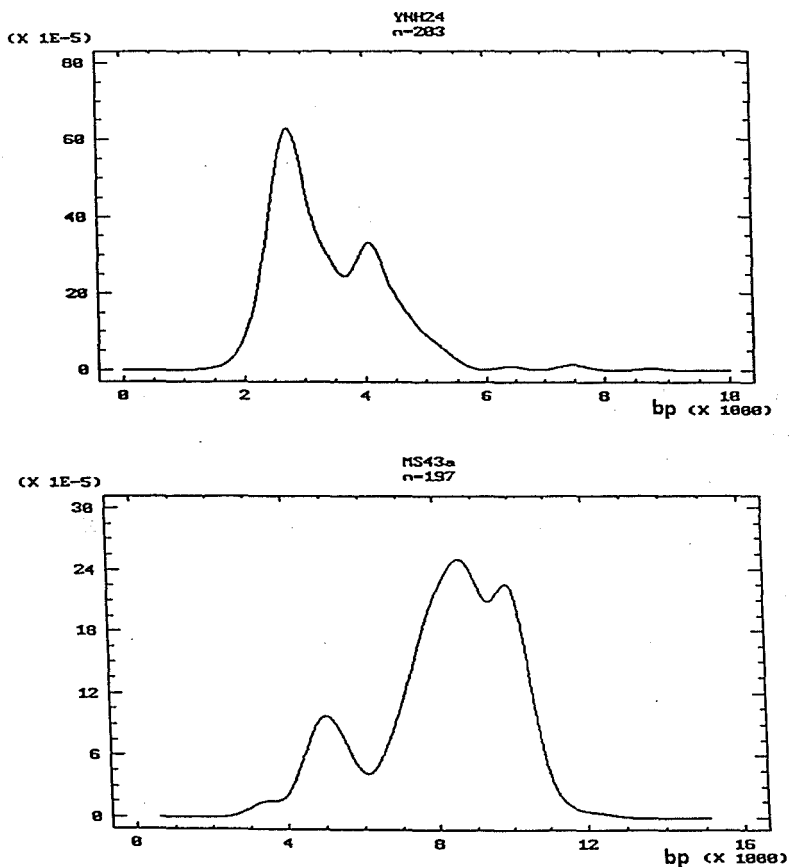


Fig. 2: Curvas de estimas de frecuencias (densidad probabilística) para los sistemas YNH24 y MS43a en la población gallega

Desde entonces en España el uso de SLPs se ha utilizado en la investigación biológica de la paternidad, aunque su uso en criminalística ha quedado restringido a unos pocos laboratorios.

La mayoría de los centros que usan SLPs con fines médico-legales en nuestro país utilizan el protocolo electroforético EDNAP, se usa como control genómico las líneas celulares K562 o EVG y tres ladders por recorrido. Habitualmente la sonda se marca por "random priming" con métodos isotópicos como ^{32}P o no isotópicos (normalmente métodos quimilumiscentes).

Un ejemplo práctico en un caso de paternidad puede verse en la Figura 3.

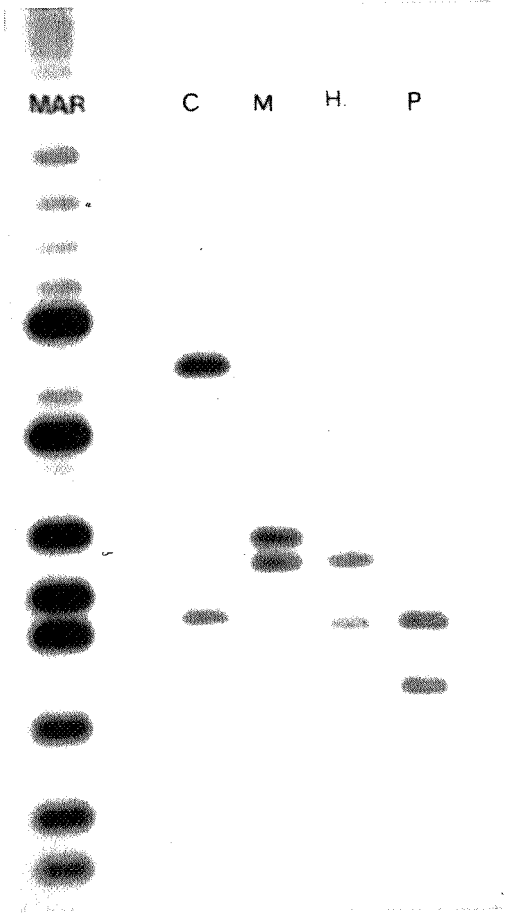


Fig. 3: Ejemplo de investigación de paternidad usando SLPs. C: Control genómico, M: Madre, H: Hijo, P: Presunto padre.

3. Análisis de polimorfismos ADN por PCR

Aunque el análisis de polimorfismos de ADN repetitivo revolucionó la Biología Forense, su uso posee algunos problemas además del referente a la estima de frecuencias y aspectos bioestadísticos de la elaboración de resultados que antes comentábamos.

El primero es la imposibilidad de análisis de muestras minúsculas (por insuficiencia de la cantidad de ADN que se puede extraer) como pequeñas manchas de sangre, de esperma o pelos, que suponen, además, la mayor parte del trabajo forense. Otro problema es el análisis de muestras degradadas, tan frecuentes en casos médico-legales, con las que puede ser imposible obtener resultados con SLPs ya que las sondas usadas detectan frecuentemente RFLPs de más de 5Kb. Un último problema es la laboriosidad del método y el tiempo de análisis, que implica que un problema médico-legal (una mancha o una paternidad) no pueda ser solucionado en menos de tres días con SLPs.

El análisis de polimorfismos de ADN por PCR solucionó muchos de estos problemas y actualmente la mayoría de los vestigios biológicos de interés criminal se analizan utilizando esta técnica.

Los loci de interés médico-legal susceptibles de análisis por esta técnica pueden verse en la Tabla 2.

Tabla 2. Locus de interés médico-legal analizables por PCR

1. ADN expresivo: HLA DQA1
 2. ADN repetitivo (sondas multilocus): 3'HVR
 3. Minisatélites: D1S80, D17S30 (pYNZ22), 3'ApoB, Col 2A1
 4. Microsatélites: ACTBP2(SE33), HUMTH01
 5. Bucle D mitocondrial
 6. Locus específicos de cromosomas X e Y (diagnóstico sexo)
-

Entre los marcadores que se utilizan hay un único marcador en ADN expresivo, el locus HLA DQA1 que se analiza con por dot-blot con sondas ASO o bien separando por electroforesis los productos y tiñéndolos con tinciones con

nitrate de plata que suele ser suficiente para separar mutaciones puntuales debido a fenómenos conformacionales que afectan a la doble cadena de ADN (Fig.4) (8).

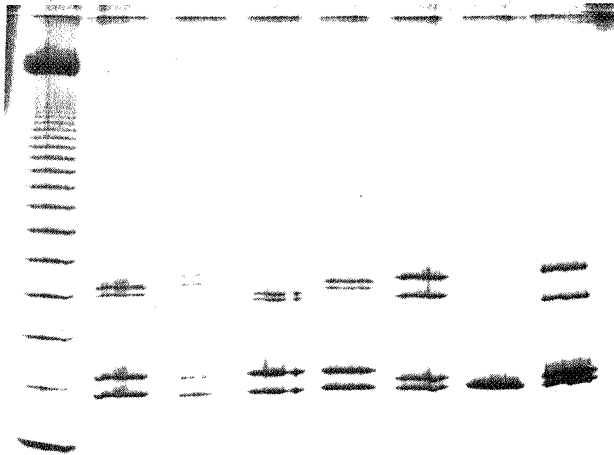


Fig. 4: Análisis del sistema HLADQA1 por electroforesis (SDS-PAGE 10-25) En muestras de sangre

Los polimorfismos de más interés son, sin embargo, los minisatélites y los microsatélites. Desgraciadamente sólo hay 4 minisatélites altamente polimórficos susceptibles de análisis por PCR (D1S80, Col2A1, 3'ApoB e YNZ22) y únicamente los dos primeros carecen de problemas como alelos intermedios o ligamiento a enfermedades. El más interesante es el locus D1S80 (pMCT118) que posee en poblaciones españolas más de 20 alelos con frecuencias bastante bien distribuidas. En la Fig. 5 se ve un caso real en el que se emplea este sistema.

Los microsatélites (STRs, short tandem repeats) son el grupo de mayor futuro. Entre ellos aunque las repeticiones de 2 y 3 nucleótidos son potencialmente útiles poseen problemas como la presencia de bandas de repetición ("slippage") que hace que su uso con fines forenses sea considerado todavía con temor. Las repeticiones de tetranucleótidos y fundamentalmente los sistemas ACTBP2(SE33) y HUMTH01 son cada vez más utilizados.

Las grandes ventajas de los microsatélites son su estabilidad y la posibilidad de PCR multiplex amplificando varios STR simultáneamente. Su mayor desventaja es la necesidad de emplear geles y sistemas de secuenciación para la diferenciación de los alelos.

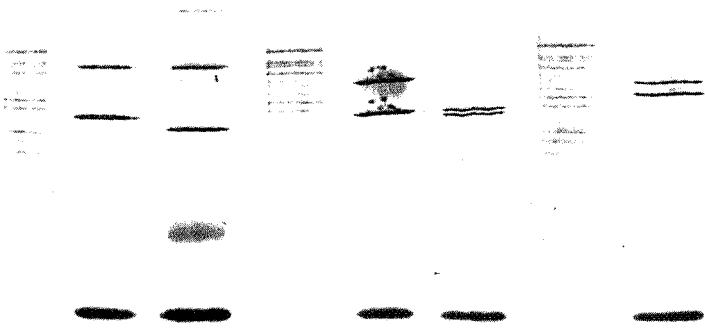


Fig. 5: Sistema D1S80 (pMCT118) en manchas de sangre y cabellos aislados de varios años de antigüedad.

El uso de fluorocromos en sistemas automatizados (secuenciadores, Genscanner) permite la visualización de mini o microsátélites, pudiendo incluso separar varios microsátélites simultáneamente aun con rangos similares de tamaño. Su única desventaja es el coste de los aparatos y reactivos.

4. “Minisatellite variant repeat” (MVR)

Este tipo de polimorfismo de secuencia ha sido descrito recientemente por Jeffreys y col. (9), basándose en el estudio de las variaciones entre las secuencias de diferentes unidades de repetición dentro del locus D1S8, reconocido por la sonda MS32.

El análisis de la secuencia de algunos minisátélites ha demostrado que las unidades de repetición dentro de cada minisatélite rara vez son todas iguales, sino que muestran cierto grado de divergencia entre ellas. Hay evidencias de que los loci que poseen un mayor grado de variabilidad en su número de copias muestran un nivel bajo de variabilidad entre las secuencias de sus unidades, presumiblemente como consecuencia de una homogeneización de la secuencia de las unidades provocada por fenómenos como la recombinación desigual. Sin embargo, el análisis de la secuencia de alelos clonados ha revelado el mantenimiento de cierto grado de variabilidad entre las secuencias de las unidades de

repetición, aún en el caso de los minisatélites más variables en su número de copias (10). En estos loci hipervariables, unidades de repetición diferenciadas por la substitución de una base por otra están presentes en un número variable a lo largo del bloque de repeticiones, y esto permite considerar a estas unidades como intermediarias en un proceso de fijación por entrecruzamiento.

El mencionado estudio de Jeffreys y col. (9) demostró la existencia de dos clases de unidades de repetición, que diferían una de otra en la presencia o ausencia de un sitio de restricción para el enzima HaeIII (unidades HaeIII+ y HaIII-). Los patrones de disposición de estas unidades dentro de los alelos del locus MS32 pueden ser analizados por PCR, mediante la amplificación por separado de los fragmentos de cada uno de los tipos de unidades. La comparación de ambas amplificaciones permite el establecimiento de un código inequívoco que identifica la pareja de alelos presentes en el ADN genómico de un individuo. Las ventajas que esta técnica presenta sobre el análisis de los polimorfismos de longitud son:

a) La identificación de una muestra viene dada por ella misma, y no hay necesidad de analizar estándares para la identificación de los alelos (por ejemplo, marcadores de peso molecular).

b) El análisis no está sujeto a errores de medición en la migración de los fragmentos, y es inmune a la distorsión de los geles y a los desplazamientos de bandas en aquellos.

c) La comparación de dos muestras se hace mediante el código generado por cada una de ellas, y no hace falta el compararlas directamente.

Sin embargo, la aplicación de los MVRs al diagnóstico biológico de la paternidad está limitada por la altísima tasa de mutación de novo que presenta el locus MS32 (el único documentado hasta el momento, aunque se está trabajando sobre el locus MS31), y por la necesidad de identificar correctamente algunas de las unidades de repetición que parecen no corresponder a las dos clases descritas.

5. Aplicaciones médico-legales

5.1 Diagnóstico de paternidad y maternidad

La investigación de la paternidad era una pericia ya solucionada antes del descubrimiento del polimorfismo del ADN. Este, sin embargo, la ha simplifica-

do enormemente y también la ha hecho más segura en situaciones difíciles (paternidades sin madre biológica, dudas de paternidad entre hermanos, paternidades sin padre con datos a partir de familiares, etc).

Hoy realizamos esta prueba con SLPs y algunos polimorfismos por PCR y la seguridad de la misma es casi absoluta.

5.2 Criminalística biológica

Es la aplicación médico-legal más trascendente del polimorfismo del ADN. Sobre todo mediante PCR cada individuo puede ser identificado con un grado de seguridad muy alto (posibilidades medias de coincidencia de 1 en 10 billones) a través de vestigios como un pelo o un simple espermatozoide.

Es especialmente importante la aplicación del polimorfismo del ADN en los delitos contra la libertad sexual, delitos que poseen una gran tasa de reincidencia y en los que ante la negativa del sospechoso no suelen existir más pruebas indiciarias que las proporcionadas por posibles restos de espermatozoide en prendas y en cavidad vaginal o anal.

La utilización de bancos de datos de potenciales delincuentes con polimorfismos ADN, ha permitido reducciones espectaculares de las cifras de criminalidad y del número de delitos resueltos en países como el Reino Unido, mientras que en nuestro país el número de delitos contra la libertad sexual no resueltos se cifra en el 70% y el número de delitos en los que se investiga el ADN es con seguridad inferior al 1%.

No parece ética la existencia de bancos de datos identificando genéticamente a todos los individuos ni posiblemente a todos los delincuentes, pero a mi modo de ver en delitos como los que comentamos sí sería razonable su existencia, por la alta reincidencia en este tipo de delitos que encubren muchas veces psicopatías graves.

La puesta en marcha de bancos de datos de estos potenciales delincuentes sería, en nuestro país, necesaria y urgente; existen laboratorios universitarios y privados que podrían construirlos sin problemas y biólogos formados que podrían ser contratados por el Ministerio del Interior para la creación de estos archivos.

5.3 Otros problemas de identificación

El polimorfismo del ADN es trascendente, y así ha sido empleado en nuestro país, en la identificación de cadáveres y restos cadavéricos (a través de piezas dentarias y sangre de los familiares, tejidos incluidos en parafina, etc) y en la asignación de restos cadavéricos al mismo individuo en catástrofes.

En conclusión, el polimorfismo del ADN ha representado una revolución total en Medicina Legal, especialmente en criminalística biológica donde su aplicación está siendo trascendente. Esta trascendencia sería mucho mayor con una adecuada estructuración de la pericia en este país y con la creación de bancos de datos de potenciales delincuentes en delitos contra la libertad sexual.

REFERENCIAS

- 1.– Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73 (1985).
- 2.– Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S.L. Individual specific “fingerprints” of human DNA. *Nature* 316: 76-79 (1985).
- 3.– Weller, P.; Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Blanchelot, A. Organization of the human mioglobin gene. *EMBO. J.* 3: 339-346 (1984).
- 4.– Nakamura Y.; Leppert M.; O’Connel 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* 235:1616-1622 (1987)
- 5.– Gill P.; Woodroffe S.; Bär W.; Brinkmann B.; Carracedo A.; Eriksen B.; Jones S.; Kloosterman A. D.; Ludes B.; Mevag B.; Pascali VL.; Schmitter H.; Schneider PM.; Thomson JA. A report of an international collaborative experiment to demonstrate the uniformity obtainable using DNA profiling techniques. *Forensic. Sci. Int.* 53: 29-43 (1992).
- 6.– Valverde, E.; Cabrero, C.; Diez, A.; Borrás, T.; Carracedo, A. Allele frequency in the population of Spain using several single locus probes. En: C. Rittner, P.M. Schneider: *Advances in Forensic Haemogenetics. Vol 4.* Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. pp 187-190. (1991).
- 7.– Alonso, S.; Castro, A.; García-Orad, A.; Arizti, P.; Tamayo, G.; Martínez de Pancorbo, M. MS1, MS31 and MS43A single locus probes: A preliminary study in the basque population and its application in paternity testing. En: C. Rittner, P.M. Schneider: *Advances in Forensic Haemogenetics. Vol 4.* Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. pp 231-234 (1991).
- 8.– Barros, F.; Carracedo, A.; Lareu, MV.; Rodriguez-Calvo, MS. Electrophoretic human leucocyte antigen HLA DQA1 typing after polymerase chain reaction amplification. *Electrophoresis* 12: 1041-1045 (1991).
- 9.– Jeffreys, A.J.; MacLeod, A.; Tamaki, K.; Neil, D.L.; Monckton, D. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354: 204-209 (1991).

- 10.– Wong Z.; Wilson V.; Patel I.; Povey S.; Jeffreys AJ. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.* 51:269-288 (1987).