

# Aplicación de la electroforesis en la identificación forense

*Application of electrophoresis in forensic identification*

Fecha de presentación: Abril 2019

Fecha de aceptación: Junio 2019

Barranco Montesinos Deyla Azucena  
CLEU Campus Oaxaca

32

*“El ADN es unas herramientas más precisas para la identificación de individuos.”*

La huella genética es una técnica que se utiliza para distinguir entre los individuos de una misma especie utilizando muestras de su ADN, se inicia con la extracción del material genético de las células de los diferentes restos y fluidos orgánicos y la posterior separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel. La electroforesis permitió la separación de los fragmentos de ADN; se concluye que la técnica de electroforesis sitúa al sospechoso en la escena del crimen, sin embargo, es posible que se necesiten más pruebas para demostrar que es culpable.

## Resumen

## Palabras clave

Huella genética, ADN, técnica de electroforesis.

## Abstrac

The genetic print is a technique that is used to distinguish between individuals of the same species using samples of their DNA, it begins with the extraction of genetic material from the cells of the different organic remains and fluids and the subsequent separation of DNA fragments by gel electrophoresis. Electrophoresis allowed the separation of DNA fragments; it is concluded that the electrophoresis technique places the suspect at the scene of the crime, however, more evidence may be needed to prove that he is guilty.

## Keyword

Genetic print, DNA, electrophoresis technique.

## INTRODUCCIÓN

Los laboratorios forenses a menudo determinan la huella genética de indicios encontrados en el lugar de los hechos para aportar evidencias en juicios. Una etapa del análisis de ADN es la electroforesis, mediante el cual se comparan los patrones de bandas producidas por las muestras de ADN cuando se separan en un gel de agarosa.

En el Colegio Libre de Estudios Universitarios Campus Oaxaca se realizó, como método de enseñanza de la técnica de electroforesis, el análisis de ADN mediante el uso de un kit comercial de BIO-RAD denominado ADN Fingerprint. Se compararon las bandas producidas por una muestra que representa el ADN recogido en la escena del crimen y cinco muestras obtenidas de sospechosos en el caso.

El ADN es incoloro, por lo cual no se puede observar la separación de los fragmentos de ADN en el gel durante la electroforesis. El kit mencionado anteriormente incluye un colorante llamado Bio-Safe, el cual debe ser utilizado al finalizar la electroforesis para visualizar las bandas de ADN. Sin embargo, el colorante que BIO-RAD provee con el kit, tiñe completamente el gel y se dificulta su lectura debido a la falta de contraste de las bandas. Como método alternativo se utilizó el reactivo de tinción SYBR Green®. Esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos de éste, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El complejo resultante ADN-SYBR Green® presenta el pico de absorción en  $\lambda = 498$  nm y el de emisión en  $\lambda = 522$  nm (correspondiente a la zona verde del espectro).

En este artículo se muestran los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis y se compara su visualización con los reactivos de tinción Bio-Safe y SYBR Green®.

## MARCO DE TRABAJO

### Estructura del ADN

El ADN es un polímero formado por dos cadenas antiparalelas constituidas por nucleótidos, unidos en forma covalente a través de uniones fosfodiéster, descrita por primera vez por James Watson y Francis Crick en 1953. Cada nucleótido contiene: un azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada. En el ADN hay cuatro nucleótidos dife-

rentes que difieren solamente en la base nitrogenada. Estas son: la adenina (A), la citosina (C), la guanina (G) y la timina (T). Las dos cadenas están estabilizadas por la formación de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias de cada cadena (A con T y C con G) manteniendo juntas las dos cadenas (Juvenal, Gangitano, & Padula, 2001).

La molécula de ADN portadora de la información genética es una larga cadena doble compuesta por nucleótidos. La ordenación de los nucleótidos a lo largo de la cadena del ADN será lo que determine la información genética (Alonso Alonso, 2004).

El ADN tiene un triple papel biológico: como base de la herencia, base de la individualización y base de la evolución. Como base de la herencia, las moléculas de ADN que los padres transmiten a sus hijos, a través de las células sexuales, son las responsables de los caracteres físicos de los seres vivos, codificados por los correspondientes fragmentos de ADN llamados genes. De ahí proviene el nombre de genoma, que se da al conjunto de ADN de una célula.

Como base de la individualización, podemos observar que los organismos son genéticamente distintos unos de otros, debido a que el ADN de las especies no es totalmente idéntico. Las pequeñas diferencias entre un ser y otro son las que permiten reconocer como tales a los distintos individuos, aunque todos pertenezcan a la misma especie.

En tercer lugar, el ADN ofrece la base molecular para la evolución. Esto debido a que la evolución tiene su origen en el error. Las mutaciones pueden ocurrir cuando uno de

los ADN hijos no es idéntico a su progenitor (Romero Casabona, 2009).

### El análisis del ADN

El análisis del genoma de cada individuo permite obtener su perfil genético individual gracias a su exclusividad. Debido a esta propiedad, el perfil genético permite diferenciar a cualquier persona, excepto en hermanos gemelos idénticos o monocigóticos. El perfil genético individual caracteriza a cualquier persona igual o mejor que sus huellas dactilares, motivo por el cual este perfil recibe también el nombre de Huella Genética (Casado González & González-Duarte, 1999).

La huella genética tiene aplicaciones en el diagnóstico de paternidad biológica y otras clases de parentesco biológico, en la identificación de sospechosos por comparación con vestigios biológicos (tales como: sangre, saliva, raíces de cabello, tejidos corporales diversos, piezas dentales, etc.) en procedimientos penales y en la identificación de individuos post-mortem (Casado González & González-Duarte, 1999).

Las secuencias del genoma que se estudian para obtener el perfil genético individual corresponden a regiones altamente variables del mismo, llamadas ADN no codificante, es decir, sin información directa o indirecta para la elaboración de elementos de importancia para la vida celular (Casado González & González-Duarte, 1999).

**“La electroforesis  
es una técnica  
para la separación  
de moléculas por  
tamaños y carga  
eléctrica”**





rosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución (Fierro Fierro, 2014).

La electroforesis separa los fragmentos de ADN

se pueden mover con más facilidad que los más grandes. Tras cierto tiempo, los fragmentos pequeños avanzarán más que los más grandes. Los fragmentos del mismo tamaño permanecen juntos y migran juntos produciendo una sola banda de ADN (BIO-RAD, 2015).

Las etapas de la técnica de electroforesis son las siguientes (Fierro Fierro, 2014):

- a) Obtención de las muestras de ADN.
- b) Preparación del gel de agarosa.



en función de su tamaño. Los fragmentos de ADN se cargan en un gel de agarosa, que se sitúa en una cubeta que contiene una solución líquida conductora. La corriente eléctrica pasa a través de dos electrodos situados en cada extremo de la cubeta. Los fragmentos de ADN están cargados negativamente, y cuando se sitúan en un campo

eléctrico migrarán hacia el polo positivo. La matriz del gel de agarosa actúa como un tamiz molecular a través de la cual los fragmentos pequeños de ADN

- c) Preparación de las muestras con el buffer de carga.
- d) Carga de las muestras.
- e) Corrida del gel.
- f) Teñido del gel.
- g) Visualización del gel con luz ultravioleta y análisis de resultados.

#### **Visualización de los fragmentos de restricción**

El ADN es incoloro, de manera que los fragmentos de ADN no se pueden ver en el gel durante la electroforesis. Se utiliza un tam-

pón de carga, que contiene dos colorantes y que se añade a la solución de ADN. Los colorantes no tiñen el ADN, pero facilitan la carga de los geles y permiten ver el avance de la electroforesis. Los colorantes migran hacia el polo positivo situado al final del gel, al igual que los fragmentos de ADN. La tinción del ADN muestra su localización en el gel (BIO-RAD, 2015).

## “Diversas aplicaciones de la electroforesis”

Existen diferentes reactivos que permiten la visualización de fragmentos de ADN, el más conocido es el bromuro de etidio (BrEt), el cual es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas) que se usa como colorante fluorescente para la visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. El BrEt absorbe luz ultravioleta de  $\lambda = 300$  nm y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual podemos observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis (Fierro Fierro, 2014). Como el bromuro de etidio se intercala en el ADN, esta sustancia tiene un poderoso efecto mutágeno y puede ser cancerígeno o teratógeno.

Existen alternativas a la tinción con BrEt. El SYBR Gold® es un colorante muy sensible con elevada afinidad por el ADN, que puede detectar cantidades de tan sólo 20 pg de ADN. Se utiliza en una dilución 1/10,000 en agua para el teñido del gel tras la electroforesis. Otros colorantes disponibles son el SYBR Green®, también de alta sensibilidad, similar al BrEt pero menor capacidad mutagénica (Fierro Fierro, 2014).

El colorante que incluye el kit de Bio-Rad se conoce como Bio-Safe. Cuando el gel se sumerge en una solución diluida de Bio-Safe, las moléculas del colorante se unen a las moléculas de ADN atrapadas en el gel de agarosa. Para aumentar el contraste y visualizar con facilidad las bandas de ADN, el exceso de colorante se puede eliminar del gel destiñéndolo con agua. Cuando las bandas sean visibles, es posible comparar los patrones de restricción de diferentes muestras de ADN (BIO-RAD, 2015).

## PROCEDIMIENTO

### MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la técnica de electroforesis se utilizó el kit de Bio-Rad “ADN Fingerprint” que contiene cinco muestras de ADN de sospechosos diferentes y una muestra de ADN encontrada en la escena del crimen. El kit también incluye agarosa en polvo, enzimas EcoRI/PstI, concentrados de la solución tampón TAE (Tris, acetato, EDTA), colorante Bio-Safe y los marcadores

HindIII. Se utilizaron dos cubetas de electroforesis (BIOBASE modelo ET-H1) y una fuente de alimentación (CSientific modelo JY-SP300C).

### PASOS O DESARROLLO EXPERIMENTAL

Obtención de las muestras de ADN. Las muestras de ADN del kit fueron rehidratadas con 200  $\mu$ l de agua estéril a temperatura ambiente. Las muestras rehidratadas de ADN se encontraban en una solución tampón a una concentración de 0.3 mg/ml en Tris 100 mM, NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, DTT 2mM, pH 8.0.

Rehidratación de enzimas de restricción. Se rehidrató la mezcla de enzimas EcoRI/PstI en 750  $\mu$ l de agua estéril, manteniéndolas en hielo.

Preparación del tampón de electroforesis. El tampón de electroforesis TAE se encontraba en el kit en solución concentrada 50x, por lo que se añadió 60 ml de TAE-50x a 2.94 litros de agua destilada para obtener la solución TAE 1x.

Preparación del gel de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon al 1%. Se añadió 1 g de agarosa a 100 ml de tampón TAE 1x. Se utilizó una cubeta de electroforesis y un peine con 8 pocillos, con un grosor de 0.5 cm.

Digestión con enzimas de restricción. Se añadieron 10  $\mu$ l de cada muestra de ADN con 10  $\mu$ l de la mezcla de enzimas a seis microtubos y se incubaron 45 minutos a 37°C.

Preparación de las muestras con el buffer de carga. Se añadieron 15  $\mu$ l de tampón de carga a cada tubo y se mezclaron los componentes.

Carga de las muestras. Se colocaron los geles de agarosa en las cámaras para electroforesis con los pocillos del lado del electrodo negativo. Se rellenó con tampón TAE 1x hasta cubrir el gel usando 275 ml de tampón para cada uno. Se cargaron las muestras en los geles de agarosa, añadiendo en el primer pocillo 10  $\mu$ l de marcadores de ADN y en los demás 20  $\mu$ l de cada muestra.

Corrida del gel. Las cámaras de electroforesis se conectaron a la durante una hora a 100 V.

Teñido de los geles. El gel número uno se colocó en una cubeta de tinción y se cubrió con 60 ml de colorante Bio-Safe durante 24 horas. Después de este tiempo se dejó destiñiendo durante 15 minutos en agua destilada. El gel número dos se colocó en una cubeta de tinción cubierta para que no le tocara la luz y se cubrió con 60 ml de solución SYBR Green® durante 24 horas. Después de este tiempo se retiró de la cubeta sin enjuagar.

Visualización de los geles con luz ultravioleta. Las bandas de ADN del gel de la figura 1a, se observaron bajo luz natural y con luz blanca. El gel de la figura 1b se visualizó en un transiluminador (UVP Benchtop UV Transilluminator Single UV) a una intensidad alta.

## DISCUSIÓN

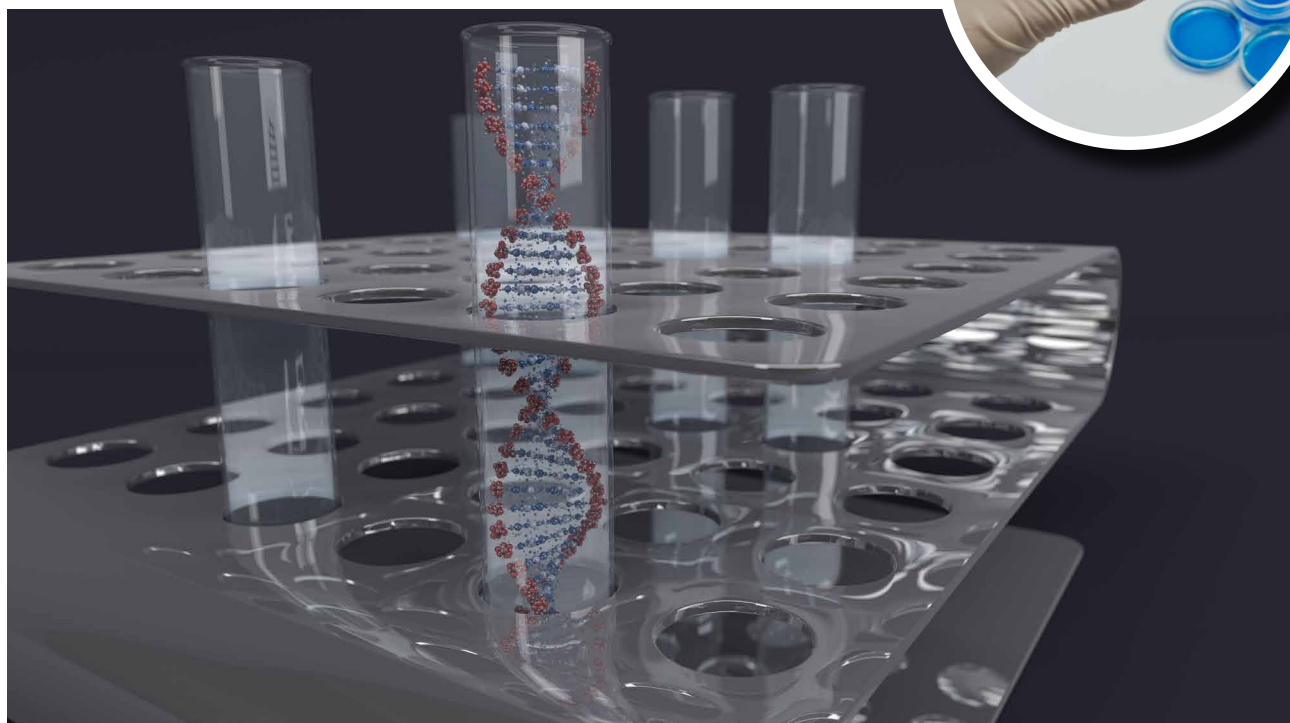
Por medio de la electroforesis en gel de agarosa, pudimos separar los fragmentos de ADN. En la figura 1a se muestran los fragmentos teñidos por medio del colorante Bio-Safe que provee el kit BIO-RAD, los fragmentos teñidos con el colorante

SYBR Green® (figura 1b) y la imagen de referencia de los fragmentos separados que contiene el manual de BIO-RAD (figura 1c). De izquierda a derecha, en el primer pocillo del gel se encuentra un estándar de ADN, en el segundo pocillo se colocó la muestra encontrada en la escena del crimen, y en los pocillos tres a siete se encuentran las muestras de ADN de los sospechosos.

Como se puede observar en las figuras a, b y c, los fragmentos de ADN se observan con una mejor resolución en el gel que fue teñido con SYBR Green®, sin embargo, no se aprecian todas las bandas que el kit menciona. Las posiciones de los fragmentos también varían en todos los casos, coincidiendo sólo algunas bandas del estándar.

## LITERATURA CITADA

1. Alonso Alonso, A. (2004). Conceptos básicos de ADN forense. Nuevas Técnicas de Investigación del Delito: Intervenciones Corporales y ADN. Madrid: Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.
2. BIO-RAD. (Septiembre de 2015). Bio Rad. Obtenido de Manual Huella Genética (ADN Fingerprint): <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/4006096ES.pdf>
3. Casado González, M., & González-Duarte, R. (1999). Los retos de la genética en el siglo XXI:



## CONCLUSIONES

De acuerdo con las observaciones de los fragmentos se concluye que, la técnica de electroforesis sitúa al sospechoso en la escena del crimen, sin embargo, es posible que se necesiten más pruebas para demostrar que es culpable. En la práctica forense, los análisis se realizan con segmentos más largos de ADN, y utilizando secuenciadores genéticos, obteniéndose más bandas que permiten la búsqueda de segmentos específicos de ADN comunes en una población, y que producirán un patrón único para cada individuo.

- genética y bioética. Barcelona: Edicions de la Universitat de Barcelona.
4. Fierro Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. En A. Cornejo Romero, A. Serrato Díaz, B. Rendón Aguilar, & M. G. Rocha Munive, Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México: SEMARNAT.
5. García Pérez, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG , 31-41.
6. Juvenal, G. J., Gangitano, D. A., & Padula, R. A. (octubre-diciembre de 2001). ADN y análisis forense. CNEA(4).
7. Müller, S., & Göllner-Heibült, H. (Spring de 2012). Genetic fingerprinting: a look inside. Science in School(22), 49-56.
8. Romero Casabona, C. M. (2009). Genética Humana. España: Universidad de Deusto.