

La escena de un crimen



Ficha estudiante

Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación. Queda prohibida su comercialización o modificación.

1. Caso práctico. Identificación de un sospechoso con el análisis de muestras de ADN

NOTA: Esta actividad es una adaptación del protocolo del kit educativo utilizado en este taller: [TEST de CSI \(BIOTED\)](#).

Ayer por la mañana apareció un cadáver en el jardín de una casa de una urbanización de Vilafranca del Penedès. El cuerpo corresponde al de José Oli, un empresario muy conocido y vecino de la zona. José Oli (63 años) es un hombre casado con Carmen Sabadell (49 años) y sin hijos. En ese momento, su matrimonio no estaba pasando un buen momento, confirmado por su asistente personal, Carlos Torres (34 años), con quien mantenía una relación romántica y tenían previsto ir a vivir juntos, según testimonio de Carlos.

La policía científica, en una primera exploración de la escena, ha determinado que se trata de una muerte violenta provocada por una pelea. A pocos metros del cuerpo, se localizó un candelabro con manchas sospechosas, que podría haber sido utilizado como arma homicida.

Aún quedan pendientes la inspección completa de la casa, las entrevistas al círculo cercano de la víctima y el informe de la autopsia. Sin embargo, las primeras hipótesis apuntan a un homicidio posiblemente relacionado con un intento de hurto.

Durante la recogida de indicios, los investigadores han localizado varios restos biológicos: pequeñas muestras de sangre halladas en el candelabro y algunos cabellos pegados a la ropa de la víctima. Este material ha sido enviado al laboratorio forense para analizar su origen y comprobar si puede ayudar a vincular a alguna persona con el crimen.



2. Objetivos

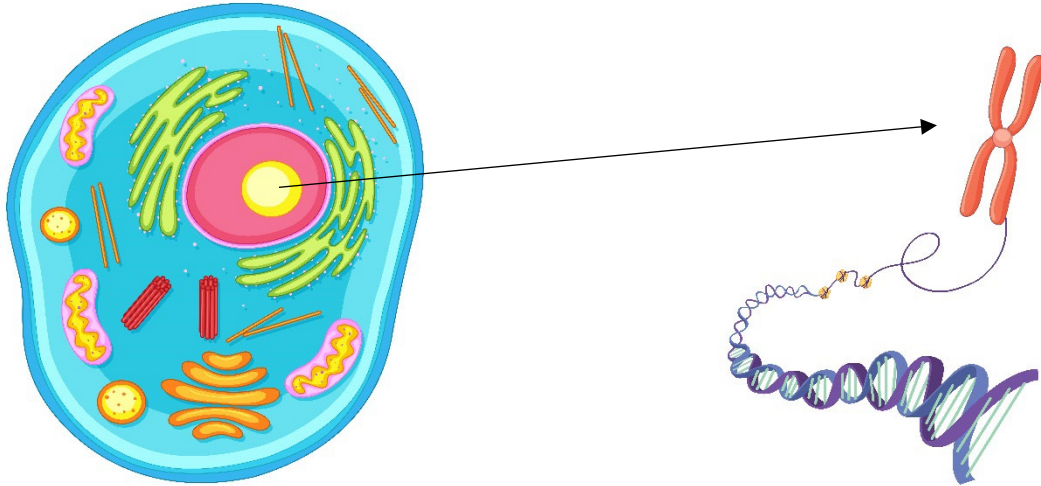
Los objetivos de esta práctica son los siguientes:

- a) Familiarizarse con el proceso policial de investigación forense en torno a un crimen.
- b) Entender qué es la huella genética y para qué sirve en la escena de un crimen.
- c) Descubrir el uso de la PCR en el análisis forense.
- d) Aprender a realizar una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.
- e) Analizar y comparar los patrones de bandas de ADN (entre muestras obtenidas en la escena del crimen y el ADN del cadáver y los posibles sospechosos).
- f) Interpretar los resultados y extraer conclusiones (determinar cuál de los sospechosos estuvo en la escena del crimen y, por tanto, será imputado por la muerte de José).



3. ADN: ¿Qué es? ¿Cómo se extrae? Polimorfismos y más!

El ADN, presente en el núcleo de todas las células eucariotas, es el material genético universal que codifica la información necesaria para el funcionamiento, el crecimiento y la reproducción celular. Esta característica es común a todas las células, ya que el ADN actúa como base de la transmisión hereditaria.



Las instrucciones contenidas en el ADN están codificadas en secuencias específicas de nucleótidos (adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C)) conocidas como genes, que son traducidas en proteínas, las moléculas que llevan a cabo la mayor parte de las funciones biológicas y estructurales del organismo. El proceso para pasar de ADN a ARN, así como el de ARN a proteínas es un proceso altamente regulado llamado transcripción y traducción, respectivamente.

Sin embargo, en los mamíferos, una gran proporción del ADN no codifica para proteínas (98%). Este ADN no codificante tiene roles importantes en la regulación de la expresión génica, la compactación del cromosoma y la respuesta celular al entorno, aunque antiguamente se pensaba que no tenía ninguna función por lo que también se le conocía como "ADN basura".

Aislamiento de ácidos nucleicos

El aislamiento de ácidos nucleicos (largas cadenas de nucleótidos como el ADN) es el primer paso para poder estudiarlos y analizarlos. En función del tejido, organismo, o ácido nucleico que se quiere purificar se aplican diferentes protocolos de extracción, pero todos siguen los mismos pasos:

1. **Lisis del tejido y/o de las células de interés:** uso de fuerzas mecánicas y adición de detergentes, que permiten desestabilizar las bicapas lipídicas de las membranas de la célula, incluyendo la membrana plasmática y la nuclear.
 2. **Eliminación de los restos celulares** (membranas, proteínas, lípidos y otros): la centrifugación permite que los restos celulares se depositen en el fondo del tubo (pelet) mientras que los ácidos nucleicos permanecen disueltos en la fase líquida (sobrenadante).
 3. **Purificación de los ácidos nucleicos:** los ácidos nucleicos se precipitan añadiendo alcohol y sales. Por un lado, las cargas positivas de la sal se unen a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos y neutralizan la carga negativa de los mismos, favoreciendo su estabilización y precipitación de la solución al añadir etanol. Cuanto más frío esté el alcohol, menor es la solubilidad de los ácidos nucleicos.
- **¿Qué tipo de evidencias se pueden encontrar en la escena de un crimen con el fin de extraer material genético como el ADN? ¿Encontraremos el mismo ADN en cualquier célula o tejido de un mismo individuo?**

Regiones polimórficas y huella genética

El **ADN polimórfico** (poli = muchos, morfo = forma) hace referencia a las regiones del cromosoma que presentan una elevada variabilidad entre individuos, excepto en los gemelos idénticos.

Hay dos tipos principales de regiones variables:


1. **STR** (Short Tandem Repeats, o **Repeticiones cortas en tándem**): regiones del genoma que presentan muchas copias repetidas de la misma secuencia de nucleótidos, de sólo 2-4 pares de bases.
2. **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeats o **Repeticiones de número variable en tándem**): regiones del genoma que presentan secuencias de 15-70 pares de bases, repetidas entre 5 y 100 veces.

El estudio de varias regiones polimórficas del genoma de un individuo permite determinar su **huella genética**, lo que nos facilita la identificación del origen de una muestra de ADN. Así pues, esta técnica

se utiliza para establecer relaciones de paternidad y parentesco, identificar restos humanos y estudiar la base genética de diversas enfermedades. Además, tienen una gran importancia en la ciencia forense, ya que permiten identificar con precisión a una persona comparando su ADN con el de una muestra recogida en una escena del crimen.

La técnica para obtener la **huella genética** requiere de varios pasos. De manera simple, primero hay que obtener una muestra, asegurándose de que el ADN no esté dañado. A continuación, se extrae el ADN y se somete a una **PCR** y a una electroforesis en gel de agarosa.

- ¿Qué determina que cada persona tenga un patrón único de bandas en el ADN?



PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** es un método *in vitro* para sintetizar enzimáticamente secuencias específicas de ADN.

Kary Mullis, que ganó el Premio Nobel de Química (1993) por esta invención, escribió "A partir de una sola molécula del material genético, la PCR puede generar 100 mil millones de moléculas similares en una tarde".

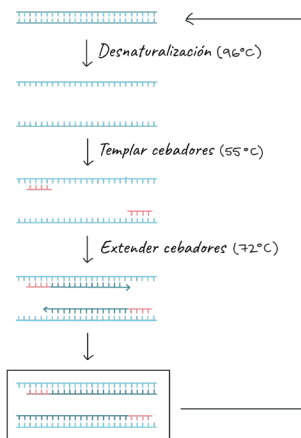
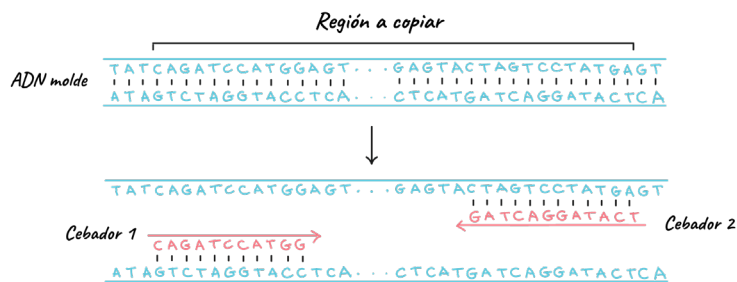
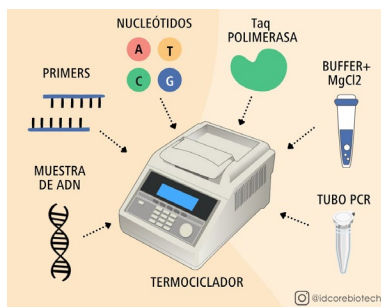
La PCR es una de las técnicas más importantes de la biología molecular y con múltiples aplicaciones en laboratorios de investigación como pueden ser la cuantificación de ADN, la clonación de genes, pero también en otros ámbitos como la detección de enfermedades hereditarias (prueba genética) y en la medicina forense.

La PCR es una técnica de fácil ejecución, ya que sólo requiere: un tubo de ensayo, el **ADN de interés** (también conocido como "**molde**"), unos reactivos relativamente simples (enzima llamado **Taq polimerasa**, 2 oligonucleótidos sintéticos conocidos como **cebadores o primeros**, y los **nucleótidos**) y una fuente de calor, proporcionada por un **termociclador**.

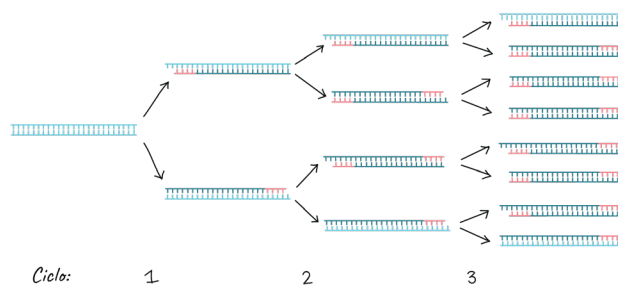
El proceso de amplificación por PCR consta de 3 pasos principales:

1. **Desnaturalización** (94°): separación de las dos cadenas complementarias del ADN (aquella molécula que hace de "molde").
2. **Apareamiento** (~55°): hibridación o apareamiento de los 2 cebadores en cada uno de los extremos de la cadena del ADN molde.
3. **Extensión** (72°): síntesis de las nuevas cadenas de ADN por alargamiento de los cebadores gracias a la acción de la Taq polimerasa, que añade nucleótidos de manera complementaria a la cadena molde.

Estos tres pasos conforman un **ciclo**, que se repite unas 25-35 veces, haciendo que el número de moléculas se duplique en cada ciclo siguiendo la fórmula 2^n , donde 'n' corresponde al ciclo; por lo tanto, la cantidad de ADN aumenta exponencialmente.



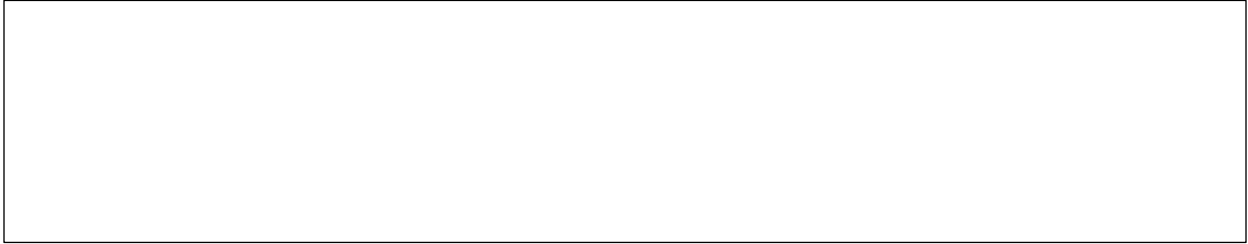
Repetir
25-35 X



Fuente: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

• ¿Para qué sirve una PCR?

- **Para realizar una PCR, ¿qué secuencia de nucleótidos hay que conocer (toda la secuencia de nuestro interés o sólo los nucleótidos de los extremos)?**



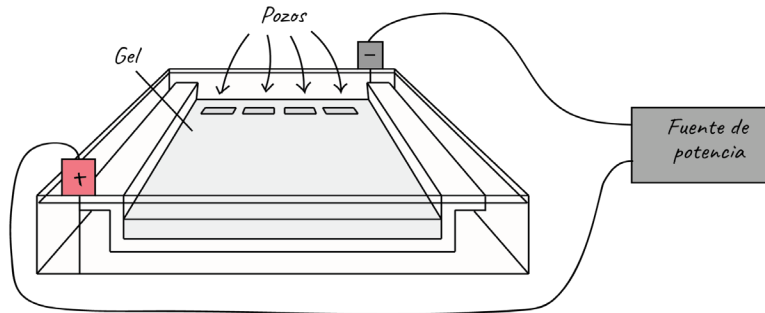
Electroforesis en geles de agarosa

La **electroforesis en geles de agarosa** (un polímero aislado de algas) es el método más usado para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ácidos nucleicos, como el ADN.

Las muestras de ADN, cargadas negativamente, se depositan en los pocillos presentes en el extremo de un gel, y gracias a aplicar un campo eléctrico, migrarán hacia el electrodo positivo. Si esta migración se da a través de una matriz de agarosa, y dado que todas las moléculas de ADN presentan la misma carga, éstas se separarán según su peso molecular; es decir, los fragmentos más pequeños migrarán más deprisa, mientras que los más grandes avanzarán más lentamente. En función del tamaño concreto de los fragmentos de ADN a separar, se emplearán geles con diferente porcentaje de agarosa; los geles más densos resuelven mejor fragmentos de tamaño pequeño, y los menos densos los de gran tamaño.

Normalmente, los geles de agarosa se preparan y se hacen correr en un recipiente llamado **cubeta horizontal**, sumergidos en una solución rica en sales (**tampón TBE**), que conduce eficazmente la electricidad. A las muestras de ADN, se les añade un **tampón de carga** que contiene un agente espesante para facilitar su carga a los "pocillos" de gel y un colorante para visualizar cómo avanzan las muestras durante la electroforesis.

Una vez finalizada la electroforesis, habrá que visualizar el gel empleando tinciones o con luz ultravioleta, para ver en qué región del gel se encuentran las diferentes muestras de ADN.



Fuente: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>

- **¿Qué nos permite la electroforesis en gel de agarosa?**

- **¿Por qué hay que cargar las muestras en el lado del electrodo negativo?**

El uso de la PCR y la electroforesis de agarosa en el análisis forense

En análisis forense de ADN de la escena de un crimen, la PCR se utiliza para amplificar y analizar regiones polimórficas del ADN (VNTR o STR), las cuales varían entre individuos. Con el fin de visualizar los fragmentos de ADN amplificados, es necesario someterlos a una **electroforesis en gel de agarosa**, una técnica que permite separar las moléculas según su tamaño y así obtener un patrón característico para cada individuo.

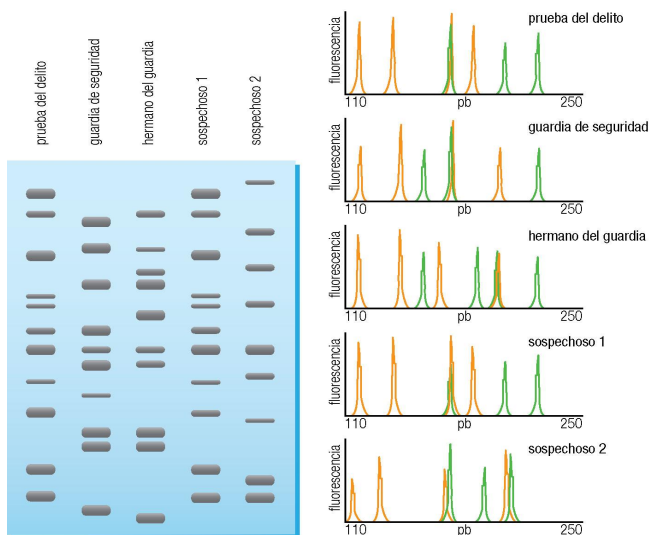
En este caso, para asegurar una mayor fiabilidad en la identificación y exclusión de sospechosos, en lugar de analizar solamente un marcador, se comparan múltiples marcadores entre el ADN de la muestra encontrada y el de las personas sospechosas para determinar posibles coincidencias. De hecho, en la práctica real, el FBI utiliza 13 marcadores diferentes para garantizar una probabilidad de acierto del 99,9%.

En esta práctica, usaremos la PCR y la electroforesis en gel de agarosa para identificar a la persona culpable. Este método corresponde al sistema tradicional, en el que casi todo el proceso se realiza manualmente por un/a técnico/a de laboratorio. Actualmente, existe un método más moderno y automatizado, en el que un equipo especializado lleva a cabo la PCR con diferentes cebadores fluorescentes y, posteriormente, analiza las muestras mediante electroforesis capilar, permitiendo así una identificación más rápida y precisa.

EJEMPLO: Uso de la huella genética para la investigación de un delito.

Se ha producido el robo de una obra de arte en un museo. Al romper la vitrina, el ladrón dejó una mancha de sangre, a partir de la cual los investigadores han podido aislar ADN. La policía interrogó al vigilante de seguridad, a un hermano suyo, y a dos delincuentes habituales, y obtuvo muestras de ADN de todos ellos.

SISTEMA TRADICIONAL vs. SISTEMA MODERNO



Fuente: <https://www.bioted.es/protocolos/TEST-CSI.pdf>

Finalmente, y gracias al análisis forense de la huella genética, se pudo identificar a la probable persona autora del delito, que fue el _____. Además, es interesante observar cómo la huella genética es más similar entre _____ que entre individuos sin ningún grado de _____.

4. Diseño del experimento

Este experimento introduce el uso de la PCR y la electroforesis en gel de agarosa como método de identificación de un criminal en el campo de la medicina forense. En este caso, se simulará cómo a partir del material genético obtenido de una muestra biológica (sangre o cabello) de la escena del crimen, se puede identificar a un criminal mediante el estudio de su huella genética.

En este experimento, se analizarán muestras de ADN (representadas con diferentes colorantes) simulando el análisis de dos VNTR. Concretamente, se analizarán 4 muestras de ADN obtenido de la escena del crimen y el de las dos personas sospechosas (Carmen Sabadell y Carlos Torres).

El patrón de ADN obtenido como resultado de la amplificación de la PCR (paso que no realizaremos en clase) será sencillo para poder analizarlo directamente en un gel de electroforesis de agarosa. El objetivo del experimento es analizar y comparar el patrón de fragmentos de ADN resultante para determinar si Carmen Sabadell o Carlos Torres estuvo en la escena del crimen.

Para llevar a cabo este experimento, hay que seguir los siguientes pasos:

1. **Obtener las muestras biológicas y extraer el ADN.**
2. **Amplificar las regiones polimórficas por PCR:** en este caso, se usa la PCR para amplificar únicamente 2 VNTRs.
3. **Electroforesis en gel de agarosa:** separar los fragmentos de ADN amplificados por PCR en un gel de agarosa para observar los patrones de fragmentación.
4. **Análisis de los resultados:** Comparar los patrones de ADN obtenidos para determinar qué persona sospechosa presenta el mismo patrón que el ADN encontrado en la escena del crimen.

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- Hay que llevar guantes y gafas de protección.
- Trabajad con mucha precaución con los equipos que implican el uso conjunto de temperatura elevada y/o fusión de reactivos.
- Vigilad al utilizar cualquier equipo eléctrico del laboratorio.

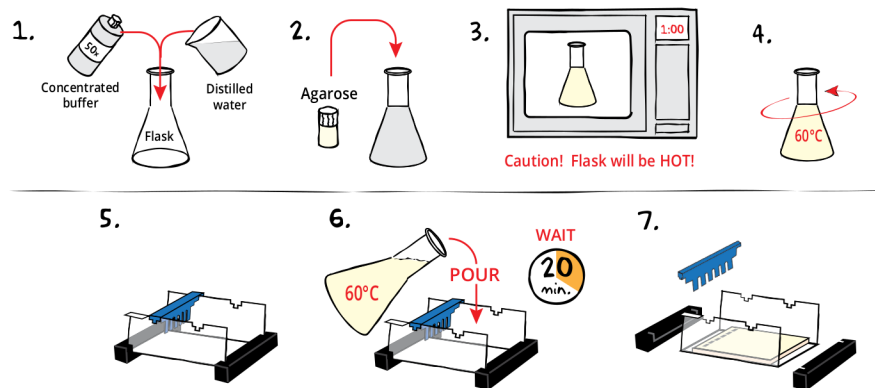
- Hay que lavarse siempre las manos con jabón y agua tras manipular reactivos o materiales biológicos en el laboratorio.

Es importante documentar todo lo que sucede durante un experimento, incluyendo las condiciones experimentales, los pensamientos y las observaciones, así como los datos recopilados y los resultados obtenidos.

- **Antes de comenzar el experimento:** leed con cuidado la introducción y el protocolo. Utiliza esta información para formar una hipótesis para este experimento.
- **Durante el experimento:** registrad vuestras observaciones y resultados.
- **Después del experimento:** interpretad los resultados y sacad vuestras conclusiones.

PARTE I: Preparación del gel de agarosa

Para poder hacer una electroforesis, es necesario preparar previamente el **gel de agarosa**, por lo que necesitaremos también preparar el **tampón de electroforesis**.



Fuente: *KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis (Edvo-Kit#135), from EDVOT*

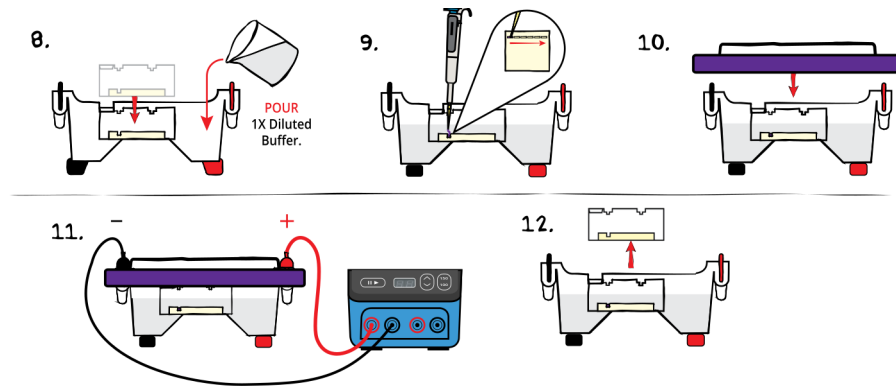
1. DILUID el **tampón de electroforesis** concentrado 10X con agua destilada (queremos conseguir una concentración final 1X).

Volumen total (mL)	Tampón concentrado 10X (mL)	Agua destilada (mL)
500 mL		

2. Para obtener **gel de agarosa al 1%** (1g/100 mL), en un volumen total de 45 mL, MEZCLAD el polvo de agarosa con la solución de tampón de electroforesis 1X en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL.

Tampón de electroforesis 1X (mL)	Masa de agarosa (g)	Volumen TOTAL (mL)
		45 mL

3. DISOLVED el polvo de agarosa calentando la solución al microondas a potencia máxima durante 1 minuto. Con cuidado, SACAD el matraz de Erlenmeyer del microondas y removed. Continúad CALENTANDO la solución en intervalos de 15 segundos hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución debe ser clara como el agua, sin partículas).
4. ENFRIAD la agarosa hasta unos 55 °C removiendo con cuidado para disipar el calor uniformemente. Si se produce mucha evaporación del líquido, añadid más tampón de electroforesis para evitar la pérdida de volumen total.
5. PREPARAD el molde para generar los geles. CERRAD bien los extremos de la bandeja para colocar el gel con las cajas de goma, y COLOCAD el peine en el lugar adecuado para formar los pocillos, donde se cargarán las muestras de ADN.
6. VACIAD la solución de agarosa enfriada en la bandeja preparada para colocar el gel.
7. ESPERAD a que el gel solidifique. En principio, en unos 20 minutos se endurecerá completamente, y se volverá menos transparente a medida que se solidifique. Cuando el gel esté solidificado, y con mucho cuidado, SACAD el peine en dirección vertical, para evitar romper algún pocillo, así como los extremos del gel, pero NO lo saquéis de la bandeja.

PARTE II: Electroforesis en gel de agarosa

Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

8. COLOCAD el gel (todavía en la bandeja) dentro de la cámara de electroforesis orientado correctamente, es decir, con los pocillos situados cerca del polo negativo (color negro) y CUBRID el gel con 300 mL Tampón de Electroforesis 1X (preparado antes), asegurando que el gel esté completamente sumergido y cubierto por el tampón.

COMPROBACIÓN DE MUESTRAS: Asegurarse de que toda la muestra esté concentrada en el fondo de los microtubos antes de cargar el gel, sacudiendo ligeramente estos tubos ya que pequeñas gotas pueden quedar en las paredes.

9. Después de poner una punta en la micropipeta, coged cada muestra (~20 µL), y CARGADLA en el pocillo en el orden indicado a continuación:

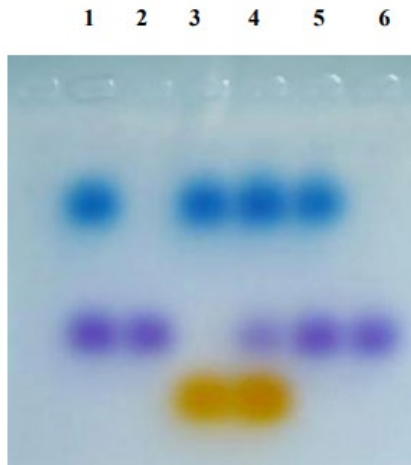
Pocillo #	Muestra	Descripción
Pocillo 1	VERDE	ADN de un cabello de la escena del crimen
Pocillo 2	ROJO	ADN de una mancha de sangre de la escena del crimen
Pocillo 3	LILA	Muestra de ADN de Carmen Sabadell
Pocillo 4	AZUL	Muestra de ADN de Carmen Sabadell
Pocillo 5	AMARILLO	Muestra de ADN de Carlos Torres
Pocillo 6	BLANCO	Muestra de ADN de Carlos Torres

10. COLOCAD la cubierta de seguridad en la unidad, situando los terminales de los electrodos en la posición correspondiente, y COMPRUEBA que el gel esté orientado correctamente.

11. CONECTAD los cables a la fuente de alimentación (el conector del cable negro a la entrada de color negro de la fuente de corriente -negativa- y el conector del cable rojo, a la entrada de color rojo de la fuente de corriente -positiva-). CONFIGURAD la fuente de corriente: VOLTAJE: 150V | TIEMPO: 20/30 minutos, e INICIAD la electroforesis, vigilando que las muestras (colorante de seguimiento) migren, pero NO lleguen a salir.
12. Al finalizar, APAGAD la fuente de corriente y DESCONECTAD los cables. Finalmente, SACAD el gel y la bandeja de colocación de la electroforesis de la cámara, y depositadlo sobre un transiluminador de luz blanca, o una cartulina blanca, y observad los resultados.

5. Resultados, análisis y conclusiones

A continuación, completad el esquema del gel de electroforesis con los resultados observados



Carril	Descripción
1	
2	
3	
4	
5	
6	

- **¿Cuál es la persona sospechosa que ha estado en la escena del crimen y, posiblemente, haya sido la que haya cometido el crimen?**

- **¿Cómo habéis sido capaces de determinar quién, presuntamente, ha cometido el crimen?**

- **¿Qué pensaríais si dos individuos presentaran un mismo patrón de bandas de ADN?**