

JOSÉ ANTONIO CANO FERNÁNDEZ

Teniente de la Guardia Civil.

Director Téc. del Dpto. Biología – Laboratorio ADN del

Servicio de Criminalística de la Guardia Civil.

BLANCA ARCE ANTÓN

Especialista del Programa FENIX de Identificación Genética

Servicio de Criminalística de la Guardia Civil.

## **GENÉTICA FORENSE: CRIMEN E IDENTIDAD**

### **CIENCIA Y JUSTICIA.**

Hace aproximadamente algo más de una década de la puesta en funcionamiento del laboratorio de ADN del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil. Los que en él trabajamos somos partícipes de este momento histórico tan importante en la criminalística, con la introducción y aplicación de la tecnología del ADN como herramienta determinante para resolver casos criminales y de identificación, así como de su importante impacto en la sociedad. La genética forense tiene un pasado relativamente reciente respecto de otras ciencias forenses, si bien ha tenido una evolución constante y un gran avance en los métodos de ensayo, técnicas y equipos, siendo paralelo a todo ello, el progresivo incremento de la casuística que demanda tales análisis.

La finalidad de este artículo es dar a conocer cómo se realiza nuestro trabajo, no desde un punto de vista eminentemente técnico y científico, sino de aquellos otros aspectos básicos que nos permitan contemplar la dimensión y alcance del análisis de ADN, fundamentalmente los relacionados con las evidencias e indicios biológicos y las diversas fuentes de ADN, que son la base del éxito de nuestros estudios, así como de la importancia de los cambios acaecidos y los que se producirán en el futuro, porque la clave para entender la técnica analítica es apreciar tanto sus ventajas como sus limitaciones.

Por otra parte, la genética forense, y en general todas las ciencias forenses, están sometidas a un continuo examen en cuanto a la confianza y fiabilidad de los métodos, técnicas y resultados, a la adecuada cualificación del personal y, en general, de la competencia técnica de los laboratorios para la realización de ensayos. Para nosotros, ha sido un objetivo prioritario alcanzar la acreditación del laboratorio de ADN como garante de tal competencia, reto logrado y mantenido desde septiembre de 2003. El sistema de calidad implantado desde entonces, es el marco de actuación por el que rigen todas las actividades del Departamento y el Laboratorio.

### **PRINCIPIOS Y PROCESOS DE LA CRIMINALÍSTICA.**

La criminalística se ocupa principalmente de determinar en qué forma se cometió un delito (crimen) y quién lo cometió (identidad). La aplicación de la ciencia al terreno legal es por tanto la de “reconstrucción” de los hechos acaecidos, y es en este sentido por lo que se le añade el adjetivo “forense”. Sin duda, el primer objetivo en esta “reconstrucción” es el de establecer diversas asociaciones: un proyectil está asociado con un arma, una huella de pisada a un zapato o una mancha de sangre a una persona. La

ciencia forense no establece culpabilidad o inocencia, sino que contribuye aportando la información de qué puede haber ocurrido y quién puede estar involucrado.

Hay diversos conceptos criminalísticos relacionados con la lógica progresión del estudio y análisis forense, un proceso de reconstrucción que comienza por conocer el origen de la evidencia física y culmina con el significado del resultado analítico. Entre estos conceptos se encuentran la “divisibilidad” y la “transferencia” de la materia, por ejemplo los restos de sangre de la víctima en las prendas del agresor o los restos de semen de éste sobre la víctima, que definen los principios científicos fundamentales relacionados con la generación de evidencias e indicios alrededor de un foco físico y temporal: el escenario del crimen. Otros conceptos, como “identificación”, “clasificación”, “individualización” o “asociación”, son parte integral de la ciencia forense y son procesos que usamos para intentar contestar los interrogantes que surgen de la investigación criminal: ¿Quién?, ¿Qué?, ¿Dónde?, ¿Porqué?, ¿Cuándo? y ¿Cómo?.

Un elemento de interés en la investigación (evidencia) se dice que es “clasificado” cuando puede ser asignado dentro de una clase con similares características, como las armas de fuego son clasificadas de acuerdo a su calibre y otras características, o los pelos, que son frecuentemente hallados en hechos criminales, en los que el especialista forense ha de examinar las características microscópicas que le permitan clasificarlo como un pelo en contraposición de una fibra, y que también le será de utilidad para colocarlo dentro de la categoría de los pelos de origen humano o animal.

Los indicios o evidencias pueden ser individualizados cuando pueden ser inferidos a una única fuente u origen, donde es improbable pensar que la adquisición de ciertas marcas o características han sido reproducidas sólo por azar. El modo de originarse una marca o característica determina si ésta es de clase o de individualización. Las características de un tipo de arma o el grupo sanguíneo, son marcas creadas por un proceso controlado, de fabricación o genético, que dan como resultado características de clase. La individualización es creada por hechos azarosos, y por tanto no controlados. Las variaciones microscópicas en el ánima de un arma que ocurren durante la fabricación dan el carácter individualizador del arma y de los proyectiles disparados a través de ella. También, el proceso de azar o no controlado de la herencia de caracteres genéticos, mutación y recombinación, contribuyen a la gran variabilidad del ADN de una persona. Estas características de individualización permiten la asociación de un indicio o evidencia con una fuente u origen y, por tanto, permiten establecer la identificación o identidad de un arma o una persona.

La individualización e identificación humana ha sido siempre un reto en el ámbito criminalístico y forense. Un sistema ideal debe identificar características únicas de cada individuo, que permanezcan en el tiempo y que permitan la comparación de muestras dubitadas de indicios biológicos con muestras de referencia o indubitadas. Los últimos avances científicos han dado un importante impulso a la individualización e identificación humana en el campo forense y, una vez más, la investigación policial y la investigación científica han tenido un mismo objetivo: la búsqueda de la verdad.

Por tanto, podemos afirmar que estos procesos, de divisibilidad, transferencia, clasificación, individualización, asociación e identificación, son la base o infraestructura para la práctica de la ciencia forense.

## **DE LAS EVIDENCIAS E INDICIOS BIOLÓGICOS.**

Los principios de divisibilidad y transferencia de la materia interactúan en la generación de indicios/evidencias antes y durante el hecho criminal, y la investigación forense comienza después del crimen con la inspección ocular del lugar de los hechos y la

localización y detección de evidencias e indicios, en particular de los biológicos para el análisis de ADN, como base de la investigación criminal.

### Factores inherentes a los indicios biológicos.

Hay que tener en cuenta ciertas circunstancias antes de que un objeto o elemento de interés para la investigación criminal (evidencia), que porta posibles restos biológicos susceptibles de análisis (indicios), sea examinado en el laboratorio.



1: Pelo - 2: Sangre - 3: Huella

INDICIOS

Los restos biológicos se encuentran en condiciones adversas cuando abandonan las condiciones controladas y estables del organismo, principalmente por las condiciones medioambientales, temperatura y humedad, a la exposición a sustancias químicas o de microorganismos, hongos y bacterias, ocasionando la degradación del indicio o la inhibición de los análisis, son circunstancias que limitan la lectura de la información genética traduciéndose en la obtención de resultados parciales o incluso

la no obtención de resultados. Por tanto, son factores que limitan pero no invalidan la utilidad del tipado de ADN, dado que no cambiarán un tipo de ADN en otro o “falsos positivos”. Una de las ventajas principales de las técnicas de análisis de ADN, siempre en continua investigación y desarrollo, es aplicar métodos (Low Copy Number, SNP’S, mini-STR’s) capaces de producir perfiles genéticos de restos muy degradados o mínimos, como los hallados habitualmente en la casuística criminal, en situaciones de catástrofes, de restos antiguos o incluso a partir del mínimo material celular depositado por un individuo que simplemente ha tocado o manipulado un objeto.

Y por último, ajenos al hecho criminal también pueden ser restos biológicos de origen humano, éstos pueden haberse depositado antes que los producidos en el crimen, por ejemplo, los restos epiteliales adheridos por el uso habitual en el pomo de una puerta mezclados con los restos de sangre de la víctima; también dicha mezcla de fluidos y restos biológicos puede producirse durante el hecho criminal, como por ejemplo, la mezcla de fluidos vaginales de una víctima de agresión sexual con el semen del agresor. Estas mezclas de fluidos deben tenerse siempre en consideración y tendrán, según las circunstancias, más o menos importancia en la investigación. Ahora bien, las mezclas de fluidos originadas posteriormente al hecho criminal, y que vamos a denominar como “contaminación”, bien sea durante la inspección ocular, en el propio laboratorio o durante la cadena de custodia, sí pueden invalidar los resultados obtenidos. La concienciación y sensibilidad a este riesgo de contaminación ha sido primordial para la adopción de adecuados protocolos de trabajo y la implantación de eficaces medidas preventivas en todas las fases del estudio criminalístico.

### Las fuentes de ADN.

Las fuentes de ADN, restos o indicios biológicos susceptibles de análisis, pueden ser clasificadas en categorías de acuerdo con su cantidad relativa de ADN, cuya importancia veremos más adelante.

De esta manera, los restos de tejidos o el semen son fuentes con gran cantidad relativa de ADN, por lo que se encontrarían dentro de la “Categoría I” en términos de potencial fuente de ADN.

La sangre es una excelente fuente de ADN, asociada a muchos casos de crímenes

violentos, sin embargo el ADN, contenido en el núcleo de los glóbulos blancos, está en una proporción minoritaria. La relación 400:1 de células rojas (sin núcleo) en relación con las células blancas, coloca la sangre en el segundo nivel de fuentes de ADN o “Categoría II” en términos de producto de ADN respecto al volumen de muestra.

La saliva y los objetos en contacto con la boca y la nariz, analizados rutinariamente en la casuística de laboratorio, son excelentes fuentes potenciales de ADN, si bien la cantidad de ADN transferida es generalmente más pequeña debido al pequeño volumen del fluido corporal que transporta los restos celulares y del pequeño área de contacto. Por ello, la saliva y zonas de contacto con la boca y nariz, estarían en la “Categoría III”.

Finalmente, las trazas de ADN o muestras límites, como por ejemplo los restos celulares depositados en un objeto manipulado, deberían ser evaluadas en relación a otras fuentes de ADN. Dada su naturaleza, en la que no todos los sustratos presentan la misma adherencia para retener suficientes células y no todos los individuos tienen la misma capacidad de transferir células, las trazas de ADN están clasificadas como “Categoría IV”.

Con objeto de minimizar la posibilidad de enmascaramiento de perfiles genéticos, particularmente en trazas de ADN, es necesario considerar las diversas categorías de las fuentes de ADN halladas sobre una evidencia. Por ejemplo, los restos de sangre (Categoría II) de la víctima en la zona anterior de una pistola o un cuchillo y los restos epiteliales (Categoría III) en la empuñadura o mango. Una cuidada separación y tratamiento de estas áreas debe permitir la posibilidad de obtener el perfil genético de cada individuo en su posición original.

Todo ello, ha de tenerse en cuenta en la observación preliminar y toma de muestras de las evidencias, base del éxito de nuestros estudios y análisis, por lo que las zonas con fuentes importantes de ADN (Categoría I) deben ser procesadas las últimas respecto a aquellas con potenciales fuentes de ADN en forma de trazas (Categoría IV). Y es recomendable, para evitar pérdidas, que las zonas con potenciales fuentes de ADN mínimas o trazas, sean recogidas mediante la aplicación de un hisopo y luego se tomen las de Categorías III, II y I, respectivamente.

Con el desarrollo de técnicas cada vez más sensibles no es raro en la casuística actual obtener un perfil genético de una muestra en la que, por tratarse de una muestra mínima e insuficiente, no ha sido posible realizar pruebas preliminares de orientación y certeza para determinar su naturaleza, por tanto, establecer hipótesis sobre el origen o fuente del ADN puede ser inapropiado. Acometer proposiciones o hipótesis a este nivel, significa que el especialista no puede expresar una opinión de cómo el ADN ha llegado a ese sitio o incluso si viene de un determinado resto biológico.

## **ANÁLISIS FORENSE DE ADN.**

Para el público en general, puede parecer que el trabajo en el laboratorio de ADN es algo misterioso o mágico, rodeado de complejas reacciones químicas y de sofisticada tecnología, donde a partir del análisis de mínimos restos biológicos se obtiene el perfil genético o el DNI biológico que establece la identidad de un individuo. Si bien es cierto que los ensayos o análisis de ADN requieren una formación y cualificación adecuadas del personal y el uso de equipos cada vez más automatizados e informatizados, no podemos considerarlo como la fase más importante en el estudio criminalístico.

### **Pruebas preliminares.**

Hay pasos importantes en el estudio criminalístico, anteriores incluso al propio examen en el laboratorio, como la búsqueda y la localización de evidencias e indicios

durante la inspección ocular en el lugar de los hechos, pero además, ya en el propio laboratorio hay unos procedimientos preliminares, previos a los análisis de ADN, que van a determinar en gran medida el éxito de éstos, y que consisten en, la a veces nada fácil tarea, de detectar y obtener las muestras con posibles indicios biológicos de las evidencias. En ambos casos, inspección ocular y procedimientos preliminares en el laboratorio, podemos usar equipos de iluminación forense o la aplicación de diversos reactivos químicos para detectar dichos indicios biológicos, si bien es el factor humano, la cualificación y experiencia del especialista, el activo más importante que va a entrar en juego en estas fases del estudio criminalístico.

En cuanto a los procedimientos preliminares aplicados para determinar la naturaleza de las muestras obtenidas, ya sean manchas, fluidos o restos diversos, hemos de indicar las actuales pruebas de orientación y certeza basadas en test colorimétricos, inmunológicos o microscópicos, destacando sobre todo el uso de los test inmunográficos, “Hexagón” para sangre humana y “PSA” para semen, caracterizados por su gran sensibilidad, especificidad y rapidez, aunque hay que tener presente la posibilidad de ocurrencia de “falsos negativos” o “falsos positivos”, documentándolos con la bibliografía y con los estudios de validación de los ensayos.

### **Genética forense: La prueba de ADN.**

Continuamente se están desarrollando métodos y técnicas de análisis de ADN en todos los procesos: extracción, cuantificación, amplificación de marcadores genéticos y detección o tipado de ADN. Desde que se creó nuestro laboratorio, la validación e introducción de nuevas técnicas y equipos ha sido una constante. A continuación se describen los cambios técnicos más significativos.

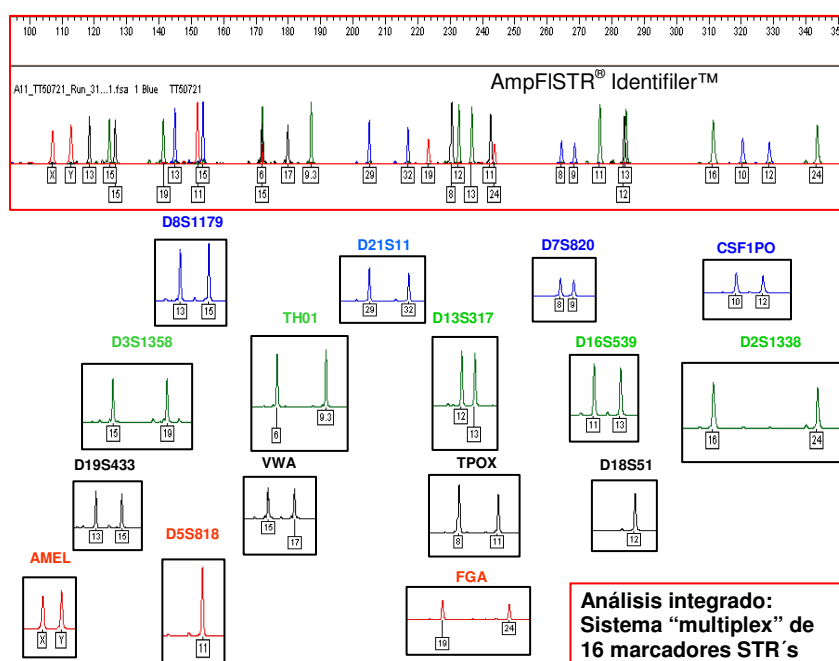
El análisis o prueba de ADN se inicia con la extracción del material genético de las células de los diferentes restos y fluidos orgánicos. Los métodos de extracción de ADN usados hasta ahora de rutina en nuestro laboratorio no han sufrido cambios significativos y utilizan solventes orgánicos o resinas quemantes, caracterizándose por la capacidad de extraer ADN de muestras mínimas y por la pureza del extracto. Actualmente se están desarrollando diversos kits comerciales, con resinas magnéticas, principalmente para su uso en biorobots, si bien el grado de sensibilidad de estos kits no es todavía superior a los anteriormente citados.

Uno de los logros más reciente y destacado ha sido la introducción de una técnica fiable para determinar la cantidad o concentración de ADN en un extracto, dato que es preciso conocer para realizar de forma óptima los siguientes ensayos del análisis de ADN. La actual técnica de cuantificación (PCR-Cuantitativa) se caracteriza por ser un método muy sensible, objetivo y, además, nos informa de la calidad del ADN extraído.

Pero sin duda los avances más importantes, cualitativos y cuantitativos, se han dado en los procesos de amplificación genética y en el de detección o tipado de ADN. La amplificación genética está basada en la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR), que consiste en realizar, mediante reacciones químicas a diferentes temperaturas, un número elevado de copias de los fragmentos de interés o “marcadores genéticos”, los cuales únicamente tienen un valor identificativo. Estos fragmentos, de diferente tamaño y marcados con un determinado colorante o fluorocromo, son analizados y detectados en los analizadores o secuenciadores mediante un proceso de electroforesis. Actualmente, el elevado número de marcadores genéticos estudiados en un sistema “multiplex”, capaz de realizarse en una misma reacción química (PCR), aporta una variación suficiente para aumentar significativamente el poder de discriminación de la prueba. En el proceso de detección, la introducción de equipos automatizados, secuenciadores y analizadores automáticos, han reducido significativamente el tiempo de análisis y el consumo de

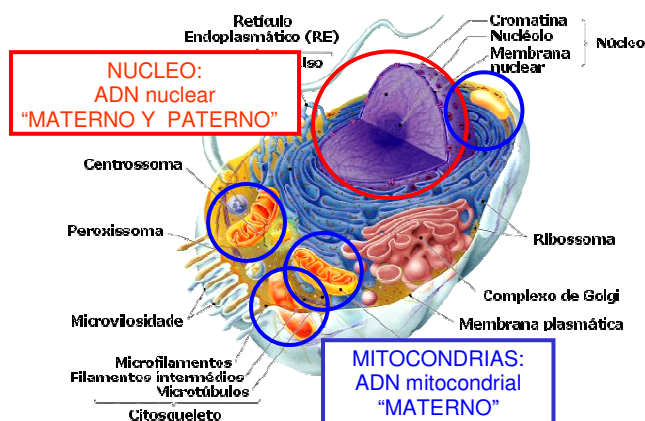
muestra, y también ha mejorado sustancialmente la lectura de los resultados o perfiles genéticos, representados en los denominados electroferogramas.

Como consecuencia del aumento de la casuística del análisis de ADN y de la capacidad analítica y, por tanto, de la gran cantidad de información generada que hay que cotejar de perfiles genéticos de indicios biológicos y de muestras de referencia de individuos, se crearon las Bases de Datos de Identificación Genética, constituyendo hoy una de las herramientas más importantes para la investigación criminal y de identificación. El Departamento de Biología del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil dispone de una Base de Datos Genéticos de Investigación Criminal (ADNIC) y otra de identificación de desaparecidos/cadáveres con fines sociales y humanitarios (FENIX), integradas en el sistema CODIS, programa informático cedido por el FBI, que permite el cotejo automatizado y sistematizado de perfiles genéticos.



### UN CASO PARTICULAR: EL ESTUDIO DEL ADN MITOCONDRIAL.

Cuando hablamos de detección y tipado de ADN de forma general nos estamos refiriendo al material genético que se encuentra encerrado dentro del núcleo celular: el ADN nuclear. Una molécula de 3.000 millones de nucleótidos que se organiza en 23 pares de cromosomas, de los cuales un par determina el sexo del individuo y que



contienen los 80.000 genes portadores de la herencia genética. Sin embargo existe otro tipo de ADN menos conocido por el público cuyo estudio y análisis se ha convertido en una de las técnicas que más se ha desarrollado y ganado importancia en los últimos años, sobre todo en los casos de identificación humana. Es el llamado ADN mitocondrial

(ADNmit) a cuya descripción, método de estudio e interpretación de resultados dedicamos un apartado especial en los siguientes párrafos, como ejemplo de la metodología seguida en el laboratorio de genética forense.

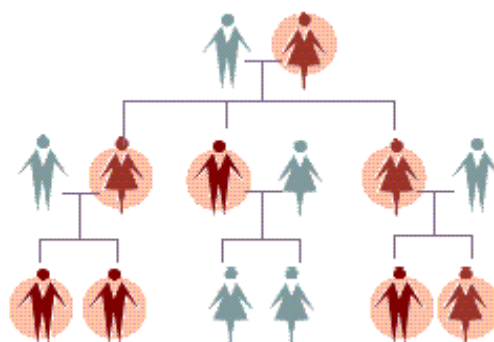
### ADN mitocondrial.

En el interior de las células eucarióticas (como las humanas) encontramos unos pequeños orgánulos llamados mitocondrias con una característica que los hace únicos: poseer material genético propio, denominado ADN mitocondrial. Este tipo de ADN posee tres características que lo hacen muy interesante y útil en los estudios forenses y de filiación humana:

1. El número de mitocondrias, aunque variable dependiendo del tipo celular y del estado funcional en que se encuentran, oscila entre las 100 y las 1.000 por célula. Si a ello añadimos que cada mitocondria presenta de 2 a 10 copias de ADNmit nos encontramos con un número grande de copias por célula (entre las 100 y las 10.000), lo que incrementa la probabilidad de que algunas de ellas se conserven íntegras en el tiempo sin verse afectadas por los procesos degradativos.

2. El ADNmit se presenta en forma de una hebra circular de 16.569 pares de bases de longitud, conteniendo en su mayor parte información vital para el desarrollo de las funciones mitocondriales. Además de estas zonas codificantes, la molécula presenta varias zonas no codificantes, siendo éstas las realmente importantes en los estudios forenses. De estas cabe destacar la más larga: el lazo D-loop o asa de desdoblamiento, de 1.200 pares de bases de longitud y que presenta una frecuencia de mutación cinco veces mayor a la del resto del genoma mitocondrial. En este asa existen dos regiones especialmente hipervariables denominadas región hipervariable 1 (HV1) y región hipervariable 2 (HV2), estudiadas como pauta habitual en los laboratorios forenses. Su alta variabilidad las hace idóneas para la diferenciación entre líneas familiares y los estudios de parentesco.

3. Cabe destacar su herencia prácticamente por vía materna. Parece ser que únicamente las mitocondrias que proceden de la madre se perpetúan en el cigoto, y con ellas su carga genética. Las mitocondrias paternas o no llegan a ser transmitidas al cigoto o son marcadas y destruidas en los procesos de diferenciación celular que se producen tras la fecundación. Por tanto, cada individuo posee la información genética mitocondrial heredada de su madre. Este hecho nos permite estudiar individuos que aun no estando relacionados directamente compartan un ancestro por vía materna, permitiendo tanto la identificación de cadáveres a partir de familiares (ascendientes o descendientes por vía materna), como los estudios de parentesco entre individuos vivos.



HERENCIA MATERNA DEL ADN MITOCONDRIAL

### ADNmit en el ámbito forense.

Prácticamente cualquier vestigio biológico es susceptible de ser sometido a estudio de ADNmit. Incluso aquellos considerados no aptos para la obtención de ADN nuclear, como los tallos de pelo donde no se encuentran células completas pero que pueden conservar un número suficiente de mitocondrias imbuidas en la matriz de colágeno; o en tejidos como el óseo, donde la cantidad y calidad de ADN nuclear recuperado puede ser insuficiente para obtener el perfil genético. El hecho de estar

presente en gran número de copias por célula, su pequeño tamaño y su conformación circular confiere al ADNmit protección y resistencia frente a los procesos de degradación ligados a la putrefacción. Allí donde sólo contamos con una copia completa de ADN nuclear tendremos de 100 a 10.000 copias de ADNmit, lo que indudablemente aumenta las probabilidades de que seamos capaces de obtenerlo en cantidad y calidad suficiente para su estudio.

Frente a estas ventajas no se han de olvidar los problemas que también presenta esta técnica. Por un lado el ADNmit no permite la identificación de individuos, sino de líneas familiares maternas; lo que en algunos casos supone más una ventaja que un inconveniente, como en la identificación de cadáveres, ya que nos permite utilizar muestras de familiares no directos que compartan un antecesor común por vía materna con el cadáver a identificar. Por otro lado, el peligro de contaminación de la muestra con ADN exógeno a la misma es grande, debido al alto número de moléculas presentes por célula, por lo que se deben extremar las precauciones en la manipulación de los vestigios biológicos tanto fuera como dentro del laboratorio. Una sola célula del personal que recoge o analiza la muestra es de tanta calidad y contiene tanto ADNmit que puede interferir en el estudio. Por último su lectura y análisis no es un proceso sencillo y requiere de la experiencia del analista para resolver aquellos puntos de la secuencia que aparezcan dudosos, requiriéndose al menos dos análisis llevados a cabo independientemente en el tiempo y por dos técnicos distintos para dar como concluyente una secuencia.

Como en cualquier otra técnica criminalística, tampoco debemos olvidar las condiciones en que se encontraba el indicio biológico ya que van a marcar de forma determinante la posibilidad de obtención de resultados óptimos. Agentes tales como la temperatura, la humedad y los compuestos químicos y productos biológicos presentes en el medio pueden acelerar de forma drástica los procesos naturales de descomposición celular y de degradación del ADN presente, tanto nuclear como mitocondrial. Algunos de estos agentes pueden incluso afectar nuestros estudios no porque destruyan el ADN, sino actuando como inhibidores en alguno de los procesos seguidos en el laboratorio, imposibilitando la obtención del perfil genético de ADN nuclear o de la secuencia de ADNmit del vestigio objeto de estudio, aún teniendo ADN suficiente para tal fin. Por ejemplo, los tintes de las prendas de vestir interfieren tanto con uno de los reactivos (la polimerasa) que impiden el desarrollo normal de la amplificación del ADN.

### **Procedimiento analítico.**

Las primeras etapas del análisis de ADNmit son comunes con las del ADN nuclear (obtención de la muestra a partir del vestigio, extracción y cuantificación). En estas fases hay que insistir en que se precisa de un buen método de *extracción de ADN* ajustado al tipo de tejido celular presente en la muestra. Los procedimientos utilizados para obtener ADN, tanto mitocondrial como nuclear, no son iguales cuando tratamos un hueso, un pelo, o una muestra de sangre, por ejemplo. Las características específicas de cada tejido deben ser tenidas en cuenta a la hora de intentar recuperar células de la matriz calcárea de un hueso, o mitocondrias de la matriz de colágeno de un tallo de pelo, ambos casos más complicados que la recuperación de células de una gota o de una mancha de sangre.

Una vez obtenido el ADN en cantidad y calidad suficiente se somete a un proceso de *amplificación* mediante la técnica de *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), la cual nos permite realizar estudios a partir de pequeñas cantidades de ADN recuperado del vestigio biológico. En el análisis de ADNmit esta PCR nos sirve para aumentar el número de copias de aquellas regiones que nos interesan: las hipervariables HV1 y HV2, que



como norma general, se estudian entre los nucleótidos 16.023 al 16.360 para la HV1 y entre los nucleótidos 73 al 340 para la HV2.

Sin embargo, no sólo es necesario un número alto de copias para poder leer estas secuencias, sino que las copias deben estar marcadas de algún modo que nos permita visualizarlas. Para ello los productos obtenidos en la PCR deben someterse a una segunda reacción de marcado en la que añadimos cuatro colorantes: uno por cada tipo de base nucleotídica (Adenina, Timina, Citosina y Guanina) cuya unión siguiendo un patrón determinado conforman las secuencias de ADN. La secuencia completa del ADNmit fue publicada por 14 investigadores de Cambridge (Anderson y col.) en 1981, y desde entonces es utilizada en todos los estudios, tanto en el ámbito forense como en el ámbito de la antropología, como “secuencia de referencia”, de ahí el nombre con el que se la conoce, también llamada “secuencia de Anderson” o “Cambridge Reference Sequence” (CRS).

Finalmente las técnicas de *secuenciación* automática facilitan enormemente la lectura de secuencias genéticas, utilizando para ello unos colorantes especiales denominados “fluorocromos”, con la capacidad de ser excitados por la luz polarizada de un láser y de emitir fluorescencia en ciertas longitudes de onda. Estas longitudes de onda son captadas por una cámara especial encargada de enviar los datos recogidos a un ordenador, donde se almacenan para su posterior análisis. Los datos obtenidos a partir de la fluorescencia son analizados y traducidos a secuencias utilizando para ello un software específico.

#### **Valoración de la prueba.**

Las secuencias obtenidas son revisadas por el analista con objeto de confirmar el análisis automático realizado por el ordenador y resolver los puntos de asignación dudosa. Una vez hecho esto se comparan con la “secuencia de referencia” y se anotan los cambios observados en nuestra muestra, expresando tanto la posición donde se encuentra el cambio como la base nucleotídica que ha cambiado. Estos cambios deben ser confirmados al menos por otro analista estudiando otra muestra de la evidencia biológica en cuestión. Esta duplicidad de estudios, aunque costosa para los laboratorios, es necesaria para evitar en lo posible errores debidos a contaminaciones cruzadas con otras muestras o con el personal que las manipula.

Una vez obtenidos resultados concluyentes de la evidencia objeto de estudio comienza su valoración. Dos muestras o vestigios biológicos pertenecientes a la misma persona presentarán idénticos cambios en el ADNmit. Si de dos vestigios biológicos se obtienen cambios distintos podemos concluir que fueron depositados por dos personas distintas y no emparentadas por vía materna. Sin embargo la proposición contraria no tiene por qué ser correcta: dos vestigios biológicos que presenten los mismos cambios en la secuencia de ADNmit no necesariamente fueron dejados por la misma persona, puesto que dos personas emparentadas por vía materna producirían el mismo resultado en los análisis. Es por ello que en la investigación criminalística el ADNmit tiene principalmente un valor excluyente: permite descartar como donante de un vestigio biológico a un individuo que no comparta la secuencia de ADNmit con dicho vestigio, excluyéndole como contribuyente; pero no permite incluirle como donante en caso de que comparta dicha secuencia.

#### **Identificación y filiación humanas.**

La utilización del ADNmit en la investigación de las relaciones familiares suele estar encuadrada en los casos de identificación de cadáveres. Por un lado se estudian los vestigios cadavéricos y se obtienen sus cambios respecto a la “secuencia de Anderson”; por otro lado se estudian los posibles familiares. Para evitar toda contaminación cruzada

entre las muestras de los familiares (indubitadas) y las tomadas de los restos cadavéricos (dubitadas), deben procesarse por separado, no coincidiendo en el tiempo y tampoco en el lugar. El laboratorio debe disponer de zonas separadas de extracción para muestras indubitadas y dubitadas. Una vez obtenidos los resultados se cotejan ambas secuencias y, al igual que en las investigaciones criminalísticas, se observa si existe exclusión entre los restos y los posibles familiares. Si ambos presentan los mismos cambios, se llega a la conclusión de que están emparentados por vía materna.

En el caso de que existan ascendientes o descendientes en primer grado del desaparecido se procederá también a realizar un estudio de ADN nuclear, siempre que sea posible, para calcular el grado de probabilidad sobre la identificación del cadáver, admitiéndose por la comunidad científica que a partir del 99,98 % se considera una paternidad o maternidad probada. De no ser posible continuar con el estudio de los perfiles de ADN nuclear, bien porque no se cuente con familiares de primer grado bien porque el estado de degradación de la evidencia cadavérica no lo permita, se debe atender al resultado de ADNmit como una prueba más que apoye la tesis de la relación familiar, pero sin que la demuestre de forma inequívoca. Su peso dependerá de la frecuencia con que la secuencia de ADNmit obtenida aparezca en la población a la que se supone pertenece el cadáver, de modo que cuanto más frecuente sea menos peso tendrá, mientras que cuanto más rara aumentará la posibilidad de que ese cadáver esté relacionado con la muestra indubitada. Dicha frecuencia permite establecer a su vez un valor que expresa el número de veces que es más probable la relación entre los restos cadavéricos y los posibles familiares frente a que no existe dicha relación. Este valor numérico unido a otros datos antropológicos como la edad, el sexo, la estatura, etc. (que pueden calcularse de manera aproximada a través de restos cadavéricos), permite llevar a cabo la identificación positiva del cadáver.

En los casos de identificación y filiación hay que tener en cuenta que la elevada tasa de mutación del ADNmit hará diferir más tarde o más temprano a dos individuos que pertenezcan a la misma rama familiar. Sin embargo aún no se tiene muy claro si dichos cambios se suceden de forma drástica, de modo que una generación filial ya pueda diferir de la materna, o si persiste la posibilidad del cambio durante varias generaciones en forma de heteroplasma: se produce un cambio en unas mitocondrias pero no en otras, por lo que al amplificar todas a la vez se observa en un mismo punto o posición dos bases diferentes, superpuestas. Por lo tanto podríamos encontrarnos con individuos relacionados por vía materna que difieran en un cambio respecto a la “secuencia de Anderson” o que poseyeran un punto heteroplásmico. Sin embargo estos casos están muy poco representados en la casuística del laboratorio, donde siempre se tiene en cuenta que una discrepancia en la secuencia de ADNmit no es suficiente para descartar la posibilidad de parentesco, puesto que ha de observarse un mínimo de dos discrepancias.

### **Programas sociales de Identificación Genética.**

En 1999 se puso en marcha el “Programa Fénix, de identificación genética de desaparecidos / cadáveres sin identificar”, mediante un convenio firmado entre la Guardia Civil y la Universidad de Granada. Este programa comenzó su andadura con el ánimo de dar una solución a aquellas personas que denunciaban la desaparición de un familiar y que consideraban la posibilidad de su muerte, al tiempo que se buscaba la forma de identificar los restos cadavéricos encontrados a lo largo del territorio nacional.

Se han venido utilizado para ello los avances del ADNmit, creándose dos bases de datos independientes. Una de ellas contiene la información genética de los restos cadavéricos que son remitidos al laboratorio del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil (Madrid). La otra contiene la información obtenida a partir de familiares que han donado muestra al Programa, y se encuentra en la Universidad de Granada. Estas dos

bases se cotejan entre si estableciendo la posibilidad de relaciones por vía materna y permitiendo emparejar restos cadavéricos con familias concretas. Los estudios se completan con ADN nuclear siempre que es posible, ofreciendo en todo caso una probabilidad para la relación familiar.

Ante la dificultad de obtener resultados de ADN nuclear en muestras antiguas y/o muy degradadas, cada vez es mayor la utilización de los estudios de ADNmit, aunque sus resultados no sean plenamente identificativos en el sentido en el que si lo son los de ADN nuclear. En los casos en los que existen otro tipo de evidencias como la estatura, la edad, el sexo, etc., la coincidencia del ADNmit aporta una evidencia más que añade seguridad a la hora de identificar. Sobre todo si las secuencias obtenidas de los restos cadavéricos y de los familiares no son muy frecuentes en la población a la que pertenecen. Esta técnica ha cobrado gran actualidad en nuestro país debido a la exhumación de restos de personas asesinadas durante la Guerra Civil, en lo que se conoce como la “recuperación de la memoria histórica”, al ser casos donde la obtención de ADN nuclear es mucho más difícil que la de ADNmit y al contarse con una cierta seguridad sobre la posible identidad de los restos que se exhuman de determinados lugares.

#### **ESTRATEGIAS DE FUTURO.**

Son diversos los retos técnicos y de gestión a afrontar por el Departamento de Biología y el laboratorio de ADN. Desde el punto de vista técnico, la actualización e implementación de nuevos métodos de ensayo y marcadores genéticos, de técnicas analíticas más sensibles y de equipos como analizadores y bio-robots.

En cuanto a los procedimientos de gestión, será una mejora importante la implementación de un sistema informatizado para la gestión de todas las actividades del Laboratorio y del Departamento de Biología (LIMS), extensible a todos los Departamentos del Servicio de Criminalística, e integrado en el Sistema de Gestión Operativa de la Guardia Civil.

Por otro lado, el progresivo y continuo aumento de la casuística que demanda el análisis de ADN, sobre todo en la realización de la reseña genética de detenidos y sospechosos, hace preciso contemplar medidas tales como la asistencia técnica externa, de personal como de laboratorios, no debiéndose descartar la creación de un nuevo laboratorio central o incluso la creación de laboratorios periféricos.

La problemática actual del laboratorio es su adecuación a la gran demanda de asuntos solicitados por Unidades y Juzgados. La disponibilidad de infraestructuras, personal, métodos de ensayos y equipos, y de un sistema de gestión de la calidad adecuados, constituyen los recursos básicos y necesarios para garantizar el mejor servicio posible a nuestras Unidades y Juzgados, con una respuesta fiable y rápida, cuyo objetivo último es conseguir la plena confianza del ciudadano y de la sociedad en general.

## BIBLIOGRAFÍA.

- P. Gill., "The less than 100 pg of DNA". *Forensic Science International*. 112(2000) 17-40.
- J. Buckleton, C. Triggs, S. Walsh. "Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press (2005).
- N. Rudin, K. Inman. "An Introduction to Forensic DNA Analysis" CRC Press (2002).
- Budowle, Bruce "Low Copy Number: Consideration and Caution". Number 01-26 publication of the Laboratory Division of the Federal Bureau of Investigation.
- Oorschot R., "Are you collecting all available DNA from touched objects?". *International Congress Series*. 1239(2003) 803-807.
- Wickenheiser A., "Trace DNA: A review, Discussion of Theory, and Application of the Transfer of Trace Quantities of DNA through skin contact"". *Journal Forensic Science*. 2002; (3): 442-450.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* (1981) 290: 457-465.
- Sullivan K.M., Hopgood R., Lang B., Gill P. Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. *Electrophoresis* (1991) 12: 17-21.
- Wilson M.R., DiZinno J.A., Polansky D., Replogle J., Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* (1995) 108: 68-74.
- Carracedo A., Bär W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G., Wilson M. DNA comisión of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* (2000) 110: 79-85.
- Tully G., Bär W., Brinkmann B., Carracedo A., Gill P., Parson W. et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* (2001) 124: 83-91.
-