

**LABORATORIOS DE GENÉTICA FORENSE. IDENTIFICACIÓN DEL  
IMPUTADO POR MARCADORES GENÉTICOS**

**AURELIO GARCÍA GONZÁLEZ**

**INSPECTOR**

## 1. RESUMEN

*La identificación del Imputado y de restos humanos ha sido siempre una de las mayores preocupaciones de las Ciencias Forenses. La huella dactilar ha sido hasta hace poco y sigue siendo hoy día una muy buena herramienta para este propósito. Sin embargo la aplicación de la Biología Molecular en los laboratorios forenses abrió nuevas perspectivas para la identificación directa.*

*La Reacción en Cadena de la Polimerasa se ha convertido en un método indispensable en los Laboratorios forenses, ya que gracias a esta técnica es posible el estudio de muestras que contienen mínimas cantidades de ADN o que lo presentan parcialmente degradado.*

## 2. INTRODUCCIÓN

La genética forense es una herramienta esencial de apoyo a la Justicia:

- Estudios de paternidad
- Identificación de vestigios biológicos relacionados con hechos delictivos
- Identificación de cadáveres en grandes catástrofes y atentados terroristas
- Identificación de restos no humanos en delitos contra especies protegidas

## 3. ESQUEMA

- MUESTRAS QUE SE ANALIZAN MEDIANTE ADN
  - Tipos de muestras según su procedencia
  - Tipos de muestras según tejido
- ESTUDIOS GENÉTICOS
  - ¿Qué es el ADN?
  - Tipos de ADN según su localización
  - Tipos de ADN según su función
- TÉCNICAS DE ANÁLISIS
  - Pruebas preliminares
  - Fases en el estudio de ADN
  - Individualización: PCR
  - Informe de ADN
- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
- CASUÍSTICA

## 4. MUESTRAS QUE SE ANALIZAN MEDIANTE ADN

### 4.1 TIPOS DE MUESTRAS SEGÚN SU PROCEDENCIA

#### 4.1.1 **Indubitadas o de Referencia:** se sabe a quien pertenecen:

##### 4.1.1.1 *de víctima:*

Restos biológicos del cuerpo del fallecido: sangre, saliva, tejidos, huesos, dientes, etc.

Restos biológicos del fallecido que permanezcan en el ámbito familiar: saliva (cepillo de dientes, sobres, sellos, colillas), restos epiteliales (maquinillas de afeitar).

##### 4.1.1.2 *de familiares:*

Restos biológicos de familiares directos del fallecido: padres, hijos... (Sangre o saliva)

##### 4.1.1.3 *de sospechoso:*

Sangre o saliva.

Normalmente se toma muestra de saliva. Esta se puede tomar mediante torunda o mediante Tarjeta FTA. (Las tarjetas FTA contienen productos químicos que lisan las células, desnaturalizan las proteínas y protegen los ácidos nucleicos de las nucleasas, la oxidación y los daños causados por radiación UV. Estas tarjetas inactivan rápidamente organismos, como los patógenos de transmisión hemática, e impiden el crecimiento de bacterias y otros microorganismos)

### 4.2 TIPOS DE MUESTRAS SEGÚN TEJIDO

- **Sangre**  
En ropas, armas, efectos, suelos, etc.
- **Esperma**  
Puede plantear problemas al encontrarnos mezclas. El perfil genético de la víctima y del presunto agresor.
- **Saliva**  
Se asientan sobre filtros de cigarrillo, chicles, cepillos de dientes, sobres y sellos, vasos, latas, botellas, pasamontañas, etc.
- **Pelos**  
Pelos aptos: arrancados.  
Pelos no aptos: caídos.  
Importante determinar si es humano.  
El ciclo de crecimiento del pelo consiste de tres etapas que se describen a continuación:  
*Fase Anagénica* (o etapa de crecimiento): el folículo se desarrolla y se produce la fibra de pelo. Esta fase puede durar entre 7 y 94 semanas,

dependiendo de la región anatómica donde se encuentre y crece a razón de 0,22-0,52 mm por día o 0,6-1,4 cm por mes.

**Fase Catagénica** (o etapa de regresión): cuando la actividad del bulbo folicular se detiene y la zona papilar se contrae mientras el folículo alcanza la fase de descanso o etapa Telogénica.

**Fase Telogénica:** En esta etapa el pelo deja de crecer completamente y comienza a caerse. Luego de ésta, el pelo entra a un nuevo ciclo de crecimiento, el cual se ve afectado por factores tales como la raza, deficiencias nutricionales y la edad. El pelo de la cabeza de un adulto esta un 85% del tiempo en fase anagénica y el 15% restante en fase de descanso.

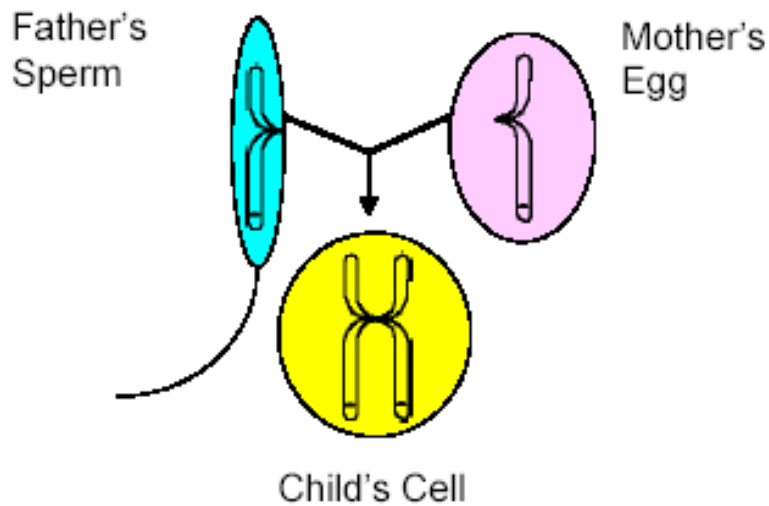
- **Uñas**  
Para la identificación o uñas de la víctima por si ha mediado lucha
- **Tejidos. Músculos u Órganos.**  
Para identificación de cadáveres  
Elección de zonas no afectadas (putrefacción o carbonización)  
Bazo e hígado mayor cantidad de ADN pero muy perecederos  
Músculo esquelético: 10-20 gr.
- **Restos Óseos**  
Las piezas esqueléticas de elección para los análisis de ADN son preferentemente las piezas dentales de apariencia exterior intacta, y los huesos largos (fémur, tibia), por presentar una gruesa cortical en la diáfisis con abundante tejido óseo compacto.
- **Dientes**  
Darán mejor resultado aquellos que no tienen tratamientos dentales, con las raíces intactas. En general, los que aún se encuentren incluidos en los alvéolos del hueso estarán mejor conservados
- **Restos Celulares**  
Prendas de vestir: zonas de rozamiento (cuello, puños y axilas)  
Empuñaduras de armas  
Casco de moto y gorras: en zonas de contacto con la frente  
Guantes

## 5. ESTUDIOS GENÉTICOS

### 5.1 ¿QUE ES EL ADN? (ácido desoxirribonucleico)

- Es la molécula fundamental de la vida
- El ADN contiene la información genética completa para definir la estructura y función de un organismo
- Se encuentra presente en el núcleo de todas las células del organismo.
- Es una molécula capaz de duplicarse copiándose a sí misma.
- Es igual en todos los tejidos y fluidos del mismo individuo (sangre-órganos-saliva-semen-uñas-huesos-pelo-piel-dientes)
- Cada persona tiene un perfil de ADN único (excepto los gemelos idénticos).

- El perfil de ADN de cada individuo permanece invariable a lo largo de toda su vida.
- La mitad de nuestro ADN procede de nuestro padre y la otra mitad de nuestra madre (salvo ADNmt y crY).



- El ADN nuclear se encuentra agrupado en los seres humanos en 23 pares de cromosomas (22 autosómicos mas los sexuales)
- Formado por secuencia de bases (letras A, C, T, y G)
- Formado por 3000 millones de unidades

## 5.2 TIPOS DE ADN SEGÚN SU LOCALIZACIÓN

### 5.2.1 Adn nuclear

- 3.000 millones de pares de bases.
- Estructura Lineal.
- Dos copias por célula.
- Herencia paterna y materna (excepto cromosoma Y).

#### 5.2.1.1Tipos de ADN nuclear

- cr. autosómicos
- cr. Sexuales



~50.000  
genes

más del  
90%

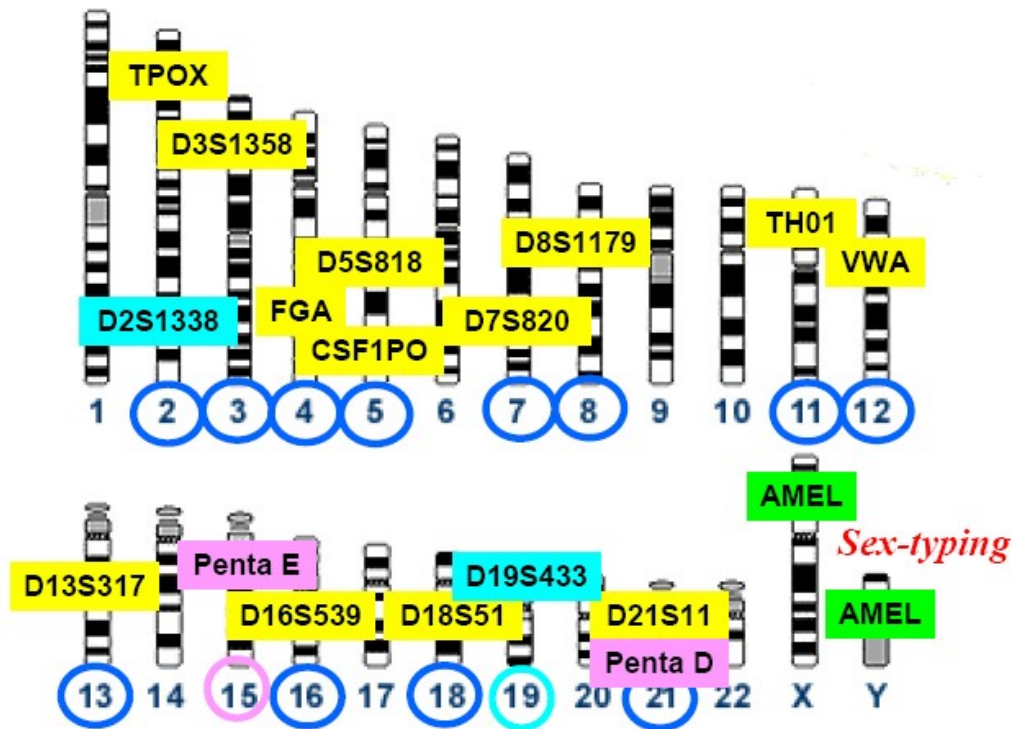
## MARCADORES GENETICOS

Dado que es imposible estudiar todo el ADN se estudian distintos fragmentos de la molécula de ADN, que vamos a denominar marcadores.

Estos deben de ser Polimórficos, es decir que exista variación entre personas.

Con el estudio de varios marcadores finalmente llegamos a la obtención de un perfil genético del individuo.

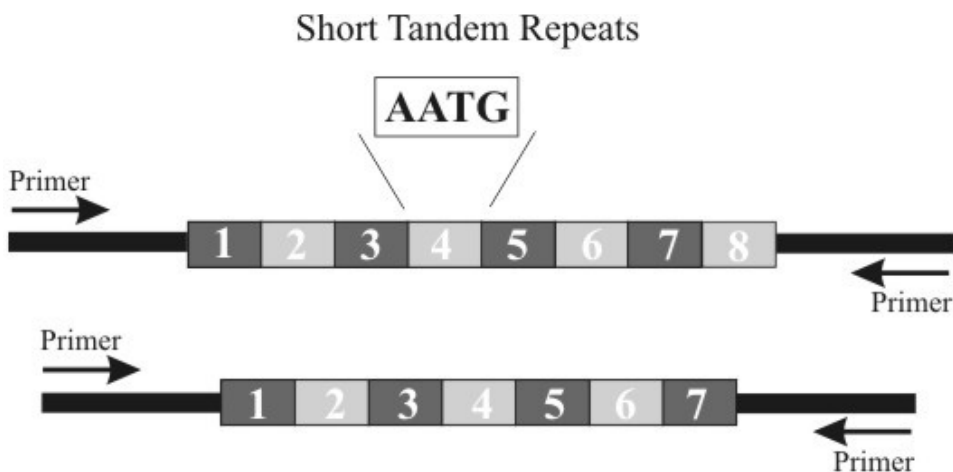
## LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA



## STRs

Son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva.

Los números que aparecen para cada marcador indican el número de veces que se repite esa estructura de cuatro bases en ese fragmento de ADN. Se denominan alelos.

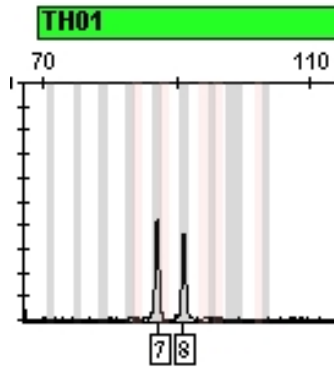


*The flanking regions where PCR primers bind are constant*

Homozygote = both alleles are the same length

Heterozygote = alleles differ and can be resolved from one another





En este caso, **TH01** tiene valores 7 y 8 para esa persona.

## UN PERFIL GENETICO

Finalmente estudiando diferentes marcadores logramos un perfil genético. Se realiza una valoración estadística.

La evaluación estadística se expresa en forma de índice de verosimilitud o **LR**, y tiene un valor de XXX trillones. Esto significa que es **XXXXXXXX trillones de veces más probable** que el perfil genético obtenido de los restos biológicos de la muestra n° X presenten los alelos descritos si proceden de **XXXXXXXX**, que si procediera de otra persona cualquiera de la población española escogida al azar y no relacionada genéticamente.

## 6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

### 6.1 PRELIMINARES

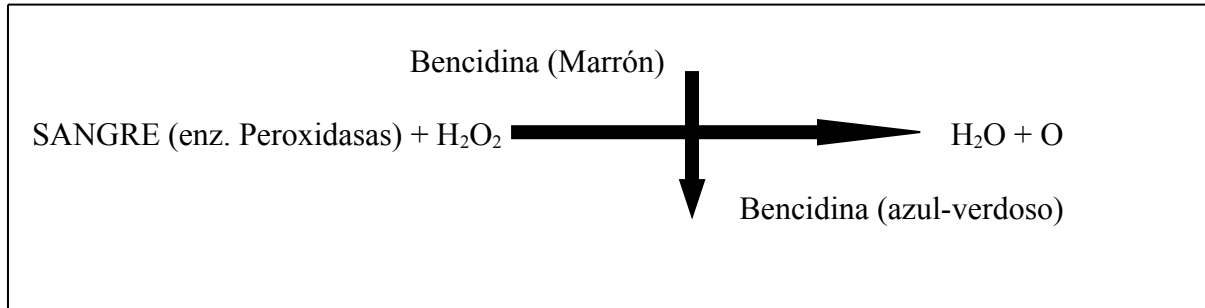
Orientadas a conocer y determinar la naturaleza de la muestra. Partimos de una Evidencia y cabe preguntarse...

**¿Es sangre?**

**Pruebas de Orientación:** Destinadas a poner en evidencia la presencia de sangre en la muestra:

a) **Adler a la Bencidina:** se trata de una prueba no especialmente específica, ya que puede dar falsos positivos, pero frente a esa falta de especificidad oponen una gran sensibilidad. Son capaces de demostrar trazas de sangre a diluciones 1:200.000.

**Fundamento:** Se basan en la presencia en la sangre de peroxididasas, enzimas que son capaces de descomponer un peroxido, en este caso el agua oxigenada, en oxígeno que oxida a la Bencidina (leucobase), la reacción es la siguiente:



El oxígeno desprendido, en contacto con las peroxididasas de la sangre hace que la bencidina tome un color azul-verdoso.

**Preparación:** Se disuelve la bencidina a saturación en Ácido Acético glacial. La reacción ha de ser inmediata a la aplicación de las gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que la bencidina se oxida también por el oxígeno del aire. Una segunda aplicación sobre una muestra de resultado negativo, nos puede dar un falso positivo. La prueba es concluyente exclusivamente cuando es negativa.

**Falsos positivos:**

Manchas de lejía,  
Jugos de frutas,  
algunos metales o efectos de metal oxidado.

**Valor de la prueba:** La prueba solo tiene valor cuando es negativa, su gran sensibilidad permite excluir que la negatividad de la prueba se deba a escasez de sangre (falta de concentración). En cambio la reacción positiva no implica que sea sangre porque cualquier muestra con peroxididasas catalasas nos va producir igualmente la reacción de oxidación.

Esta prueba debe realizarse SIEMPRE en campana de seguridad biológica. En caso de que el efecto no pueda ser introducido en la misma para la realización de la prueba y haya de hacerse fuera de campana, se realizara fuera de la misma mediante una torunda impregnada en la preparación de Adler, y se pondrán la mascarilla todos los usuarios de la sala. Esto es debido a que la Bencidina es un compuesto cancerígeno de tipo 1 (Hay estudios suficientes que demuestran la relación directa de su utilización y la aparición de cáncer).

**Pruebas de Certeza:**

Absolutamente específicas. Se basan en poner de manifiesto algún elemento característico de la sangre, en este caso la Hemoglobina.

a) **Cristales de Teichman:** es una prueba cristalográfica. Se basa en la existencia de ciertos derivados de la Hemoglobina que tienen tendencia a cristalizar, en este caso el Clorhidrato de hematina y el hemocromógeno.

**Fundamento:** Se trata a la hemoglobina en caliente con un ácido orgánico (ac. Acético glacial), lo que produce un desdoblamiento de esta en hemo y globina a la vez que se oxida el hierro del grupo hemo que en presencia de una sal halogenada (cloruro) se forman cristales de clorhidrato que son visualizados al microscopio óptico.

**Método:** - En principio se realizaba calentando la sangre solamente con Ácido Acético hasta llevar a ebullición, repitiendo la operación de ebullición 4 o 5 veces se observan los cristales de Teichman al microscopio por cristalización con el cloruro sodico existente en la propia sangre.

- Modificación: Reactivo de Gabriel-Bertrand donde se añade una sal halogenada junto con el Ácido Acético para forzar la reacción.

La observación microscópica de la preparación muestra unos cristales de forma prismática alargada de color pardo oscuro.

#### **Reactivo de Gabriel Bertrand:**

- 5 gr. Cloruro magnésico cristalizado.
- 5 ml de agua bidestilada.
- 25 gr. de glicerina al 30 % (si está líquido el glicerol y al 100%, se añade 7,5 ml. de glicerol hasta 25 ml. de agua bidestilada)
- Hasta 100 ml. de ácido acético glacial.

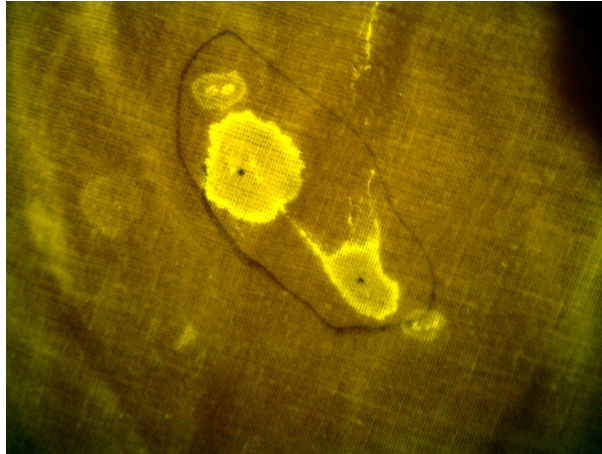
Es recomendable el uso de la campana de seguridad biológica para efectuar dicha reacción y evitar aspirar los vapores cuando se somete el portaobjetos al calor. La valoración de la prueba irá en función de la concentración de hemoglobina que presente la muestra.

#### **¿Es esperma?**

Orientadas a conocer y determinar la naturaleza de la muestra, en este caso, esperma humano.

Consideramos cuatro pruebas, **la luz forense, el test colorimétrico, el inmunotest y la visualización de espermatozoides**, que se definen a continuación según el orden que debe seguirse:

- a) **Luz forense de 495 nanómetros**, para detectar la presencia de posibles manchas de esperma. Se basa en la fluorescencia emitida por las flavinas, presentes en gran cantidad en el esperma humano. La coloración de las manchas bajo la luz láser es **blanquecina y el aspecto denso**, con **difusión cromática desde el centro hacia la periferia** de las mismas (menos densas hacia el exterior de la mancha). Pueden darse falsos positivos (orina, sudor, lejía, flujo vaginal), así como falsos negativos, en casos de telas con elastano u otras fibras de color negro que puedan absorber la fluorescencia emitida.



- b) **Test colorimétrico de la fosfatasa ácida**, Dicha enzima está muy presente en el esperma, siendo su actividad enzimática muy alta. Para ello se utiliza una solución de ácido alfa-naftil-fosfato en tampón citrato, con la que se impregnan las muestras a comprobar, de tal forma que la muestra quede sumergida en la solución.

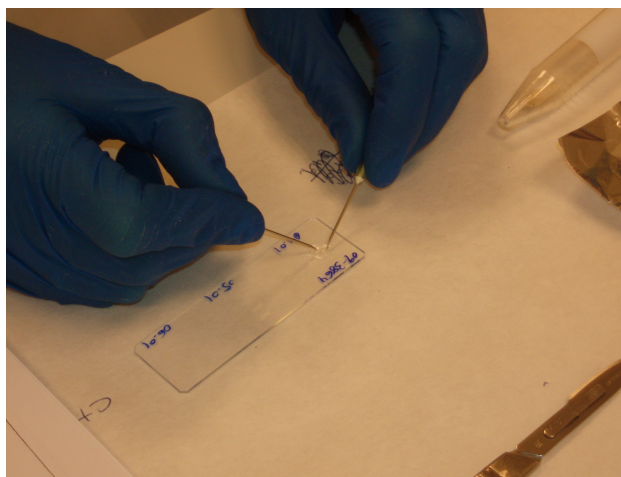
La preparación consiste en tomar con una espátula aproximadamente media cucharita de espátula de polvo de naftil y añadir con una pipeta Pasteur 1 mililitro hasta llenar el eppendorf, resuspender para diluir completamente. Se añaden un par de gotas a todas las muestras a testar.

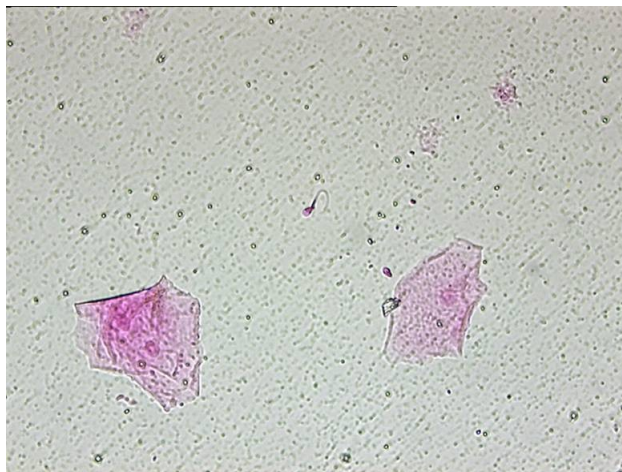
Tras diez minutos, se añade una gota de una solución de azul sólido en tampón citrato (preparada de la misma forma que el naftil), debiendo tornarse de color violáceo en caso de presencia de esperma. Pueden obtenerse falsos positivos o bien coloraciones intermedias, debido a que otros fluidos, como la sangre o los flujos vaginales, también poseen fosfatasa ácida, aunque en menor cantidad.

- c) **Visualización de espermatozoides mediante tinción con eritrosina amoniacal**. Dicha tinción permite visualizar espermatozoides y células diploides y realizar un conteo por campo visual. **En caso de individuos azoospérmicos, esta prueba será negativa, puesto que no se visualizarán espermios.**

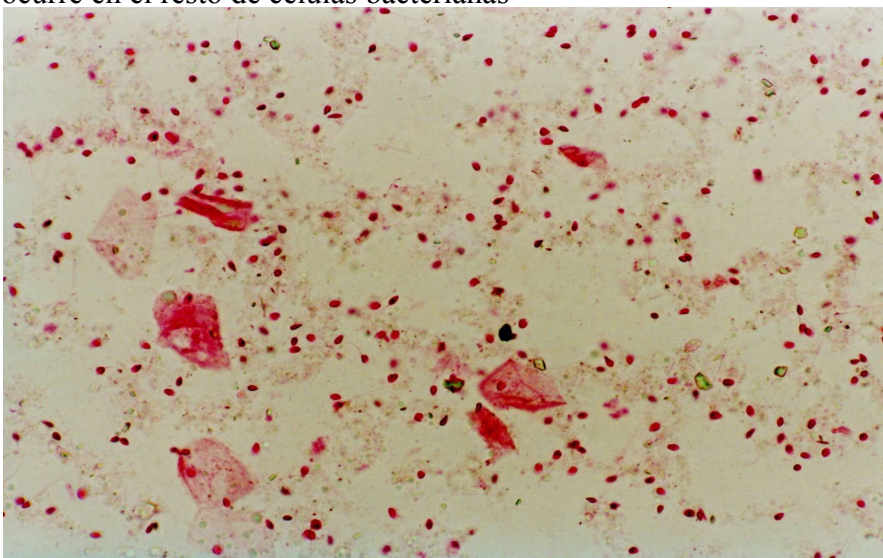
**En caso de que sea positiva, la certeza es del 100 %.**

La preparación se realiza sobre un porta, deshilachando (foto izq. inferior) con agujas o bisturís una mínima porción de la tela, torunda o una mínima cantidad de lavado vaginal, impregnados en 10 microlitros de agua miliQ autoclavada. Después, se deja secar y se añaden 8-10 microlitros de eritrosina amoniacal, se coloca un cubre y se visualiza a microscopio óptico





Una de las consideraciones a tener en cuenta en la visualización a microscopio óptico es la diferencia entre espermatozoides y bacterias de la propia flora vaginal o bien otros tipos celulares (procedentes de infecciones). Es importante diferenciar los espermatozoides por la doble tinción (acrosoma vs. resto de cabeza espermática), cosa que no ocurre en el resto de células bacterianas



**c) Inmunotest del antígeno específico de próstata (PSA) o P30.** En el líquido seminal existe una gran cantidad de PSA, por lo que puede ser detectado mediante un inmunotest de alta sensibilidad y específico de humanos. Hay que tener en cuenta que la PSA se encuentra también en la orina humana así como en el suero sanguíneo, aunque en menor concentración que en el líquido seminal, por lo que puede originar falsos positivos durante un estudio.



**¿Es saliva?**

### **Pruebas de Orientación**

#### **Test de la Amilasa salival con PHADEBAS**

**Fundamento.** La pastilla está compuesta por un almidón que lleva incluida en su estructura un colorante. En presencia de saliva, degrada el almidón y el colorante se libera en el medio. Al leerlo veremos el medio azul oscuro.

Si no hay saliva, el almidón no se degrada y el colorante no queda en el medio. Al leerlo lo veremos transparente.

**¿Es un pelo?**

**Visualización microscópica:** Las características que debemos observar microscópicamente para poder realizar una analítica adecuada según el tipo de pelo al que nos enfrentemos son:

- **Determinación del origen:** determinar si nos encontramos ante un pelo humano o por el contrario se trata de un pelo no humano. Lo cual se aprecia observando la medula, la cutícula y la forma del bulbo.
  - La medula en el caso de pelos humanos es muy estrecha o esta prácticamente ausente, mientras que en el caso de pelos de origen no humano es gruesa y normalmente con forma de collar de cuentas apiladas.
  - La cutícula humana esta formada por escamas muy imbricadas entre si, mientras que en el caso de escamas de pelos no humanos estas están mas separadas.
  - El bulbo de los pelos humanos en fase telegénica tiene forma globosa limpia, mientras que los pelos no humanos la forma es más alargada con forma de raíz.
  
- **Ausencia o presencia de bulbo o raíz.** Si carece de bulbo, estaríamos ante un fragmento de pelo, o si por el contrario tiene bulbo, pelo completo.
  - En el caso de encontrarnos frente a un fragmento terminarían los estudio para ADN nuclear, ya que este solo esta presente en el bulbo del pelo, nos enfrentaríamos a una analítica de ADN mitocondrial.
  
  - Dentro del conjunto de pelos que tengan bulbo existen algunos que son mejores que otros para los estudios de ADN. Los pelos que aún se encuentran en fase de crecimiento presentan bulbo activo rico en células y por ello son idóneos para los estudios de ADN nuclear. Los pelos caducos no presentan tal actividad y por ello no se obtienen resultados positivos en la analítica de ADN nuclear pero si son aptos para los estudios mediante ADN mitocondrial.

Se pueden diferenciar **tres fases en la vida de un pelo:** anagénica (fase de crecimiento y elevada actividad celular), catagénica (fase de madurez con moderada actividad celular) y telogénica (fase terminal sin actividad celular). Lógicamente, los pelos idóneos para el análisis de ADN son los anagénicos, seguidos de los catagénicos. Como norma general, los telogénicos se desecharan si se pretende realizar un estudio de ADN nuclear, pero no si el estudio es de ADN mitocondrial.

El pelo **anagénico** que puede aparecer en la escena de un crimen normalmente ha sido arrancado. Es fácil identificarlos con el microscopio pues presentan bulbo en forma de cuchara, o de botón o de abanico; muchas veces el bulbo está retorcido y la zona del tallo próxima a él presenta una cubierta epitelial (manguito).

El pelo **telogénico** puede haber sido arrancado, pero lo normal es que se caiga espontáneamente. Presenta bulbo en forma de palillo de tambor y no suele aparecer la cubierta epitelial.

Finalmente, el pelo **catagénico** presenta un estadio intermedio entre el primero y el segundo. Es difícil discriminar qué pelos en estado catagénico darán resultados positivos en la extracción de ADN y cuáles no lo harán; por ello, recomendamos que se intente la analítica de ADN en todos ellos.

Lo siguiente que cabe preguntarse es **¿la evidencia es HUMANA?**

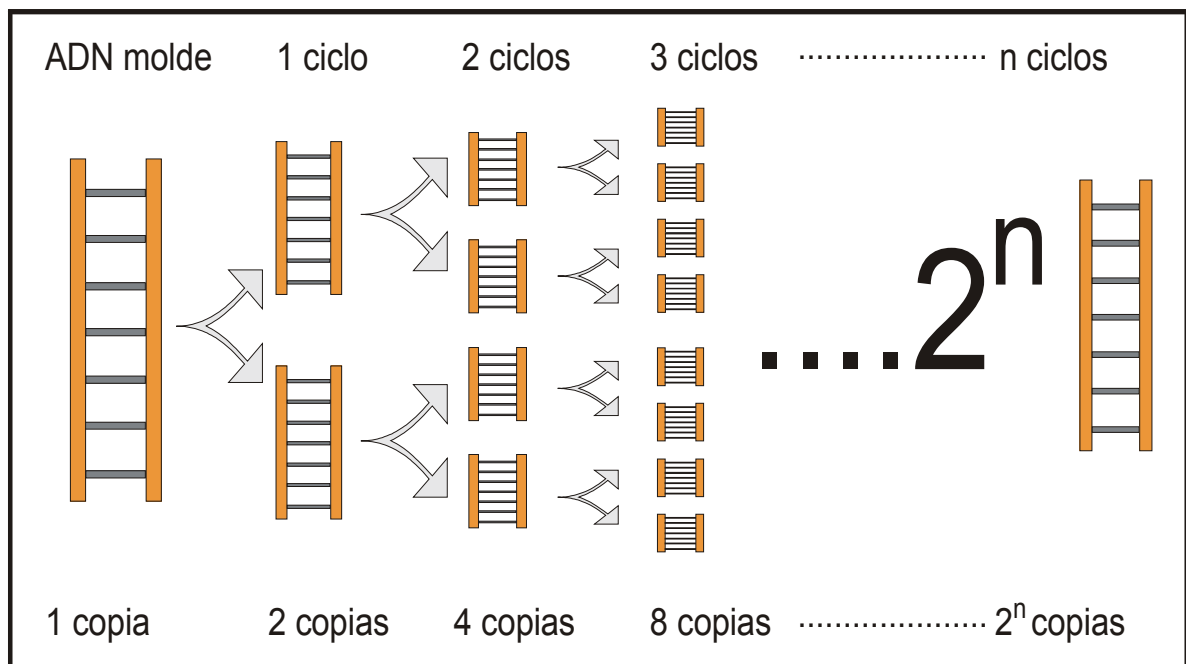
En ese caso se realizan estudios de Individualización mediante Estudios de ADN

### 6.2 FASES EN EL ESTUDIO DE ADN

- Extracción y Cuantificación del ADN
- Cualificación y Cuantificación del ADN
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- Análisis de:
  - Autosomas
  - Cromosoma Y
  - Mt-AND

### 6.3 PCR

Es una técnica de [biología molecular](#) desarrollada en [1983](#) por [Kary Mullis](#), Premio Nobel de Química en [1993](#). El objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de [ADN](#) particular, partiendo de un mínimo; basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Es una amplificación exponencial





## 7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Base de datos policial sobre identificadores obtenidos a partir del ADN, regulada por LO 10/2007

Se significa que en la actualidad operamos como alimentadores locales de la citada base de datos nacional, tanto las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado (CNP y GC), las Policías Autonómicas Vasca, Catalana y Navarra, así como el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses dependiente del Ministerio de Justicia.

### 7.1 TIPOS DE COMPARACIONES:

#### 7.1.1 Inclusión

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

**TIPOS DE COMPARACIONES:  
COINCIDENCIA**

**VÍCTIMA**

**PERFIL GENETICO**

- TH01: 6-9.3
- TPOX: 9-11
- CSFIPO: 10-10
- D3S1358: 16-16
- SEXO: XY

**SI COINCIDE**

**CAMISA  
SOSPECHOSO**

- TH01: 6-9.3
- TPOX: 9-11
- CSFIPO: 10-10
- D3S1358: 16-16
- SEXO: XY

**INCLUSION**

(CALCULO ESTADISTICO)

=

→

**Exclusión**

GOBIERNO DE ESPAÑA  
MINISTERIO DEL INTERIOR  
COMISIÓN NACIONAL DE POLICÍA  
COMISIÓN NACIONAL DE POLICÍA FORENSE

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### TIPOS DE COMPARACIONES: COINCIDENCIA

**VÍCTIMA**

- TH01: 6-9.3
- TPOX: 9-11
- CSF1PO: 10-10
- D3S1358: 16-16
- SEXO: XY

**NO COINCIDE**

**CAMISA SOSPECHOSO**

- TH01: 7-9
- TPOX: 8-8
- CSF1PO: 11-12
- D3S1358: 17-18
- SEXO: XX

**EXCLUSION**

#### 6.4 INFORME DE ADN

#### CONCEPTO DE CALIDAD

- ¿Quiénes son nuestros clientes?  
**Unidades Policiales de investigación y Jueces y Tribunales nacionales e internacionales.**
- ¿Qué necesidades tienen?:  
Resultados **válidos y fiables** para la toma de decisiones que afectan a derechos fundamentales.
- Trabajamos para unos “clientes”.
- Nuestros clientes necesitan saber que somos:  
Técnicamente competentes y damos resultados fiables.



Alguien tiene que avalar esa **CONFIANZA ENAC-ACREDITACIÓN**

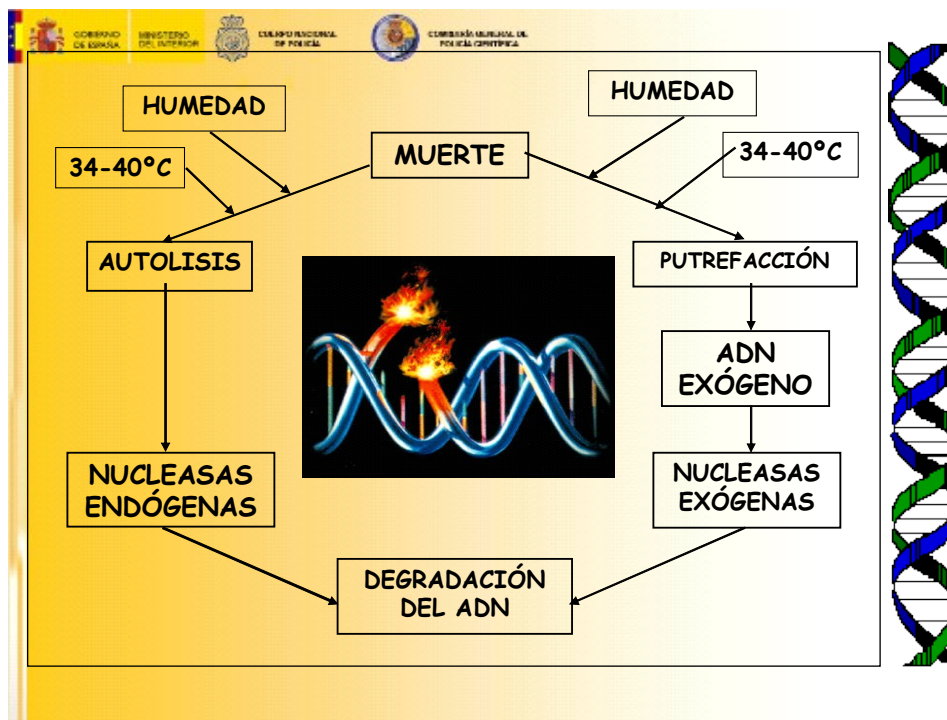
### ENAC: Entidad Nacional de Acreditación.

- ENAC es una organización declarada **de utilidad pública, independiente y sin ánimo de lucro, auspiciada y tutelada por la Administración**, sus actuaciones se basan en los **principios** de imparcialidad, independencia y transparencia.

## 7. CASUÍSTICA

### 7.1 Impacto de las muestras con ADN degradado

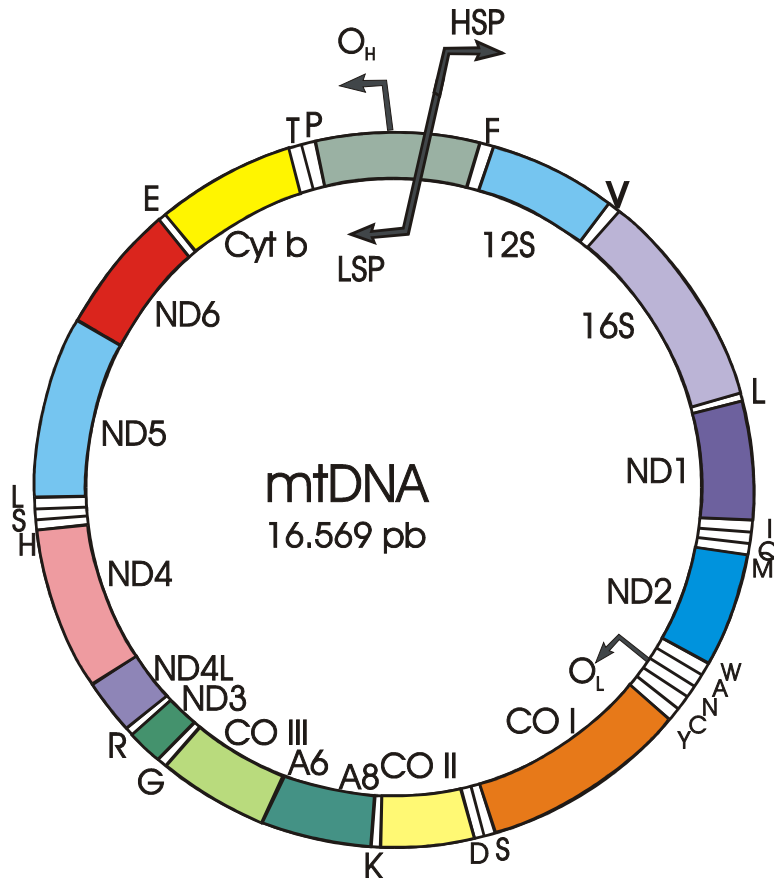
No se pueden recuperar fragmentos de ADN lo suficientemente largos y el análisis de algunos marcadores falla (causado por calor, agua, bacterias...)

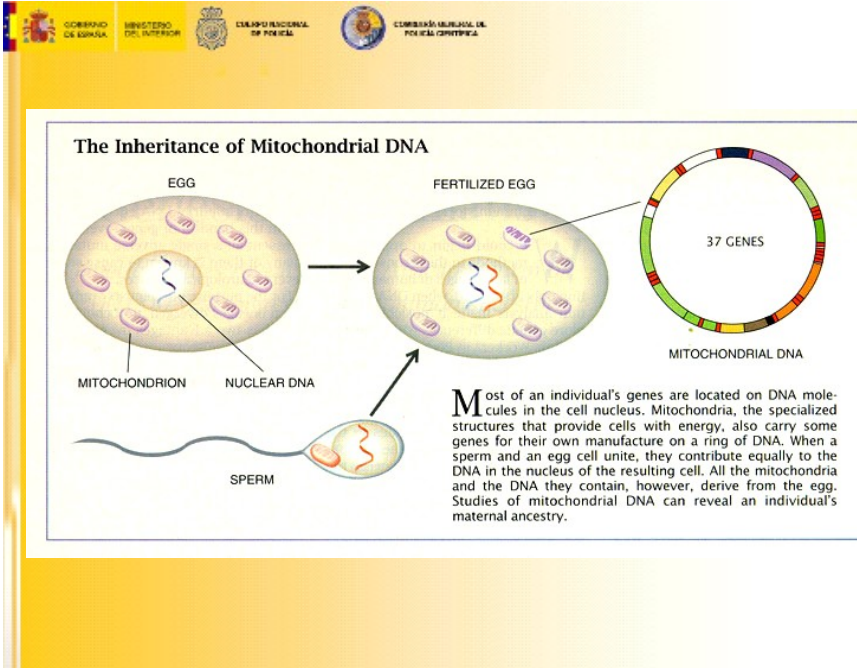


### 7.2 ADN Mitocondrial

- molécula circular.
- genoma simple: 16.569 pb.
- numerosas copias por célula.
- contiene secuencias polimórficas.

- herencia materna, no sufre recombinación.
- no identifica individuos.
- menor poder de discriminación.
- herramienta de apoyo





## USOS ADNmt

- MUESTRAS MUY DEGRADADAS bien debido a condiciones ambientales extremas o a su antigüedad.
- MUESTRAS CON ESCASA CANTIDAD DE ADN (pelos con bulbo telogénico o fragmentos de pelos).
- ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES FAMILIARES VÍA MATERNA (apoyo en la identificación de cadáveres con familiares no adecuados)

## 7.3 Cromosoma Y

- herencia paterna
- no identifica individuos
- permite relacionar familiarmente
- se utiliza para: investigaciones criminales, genealogía, evolución, análisis de poblaciones.

