

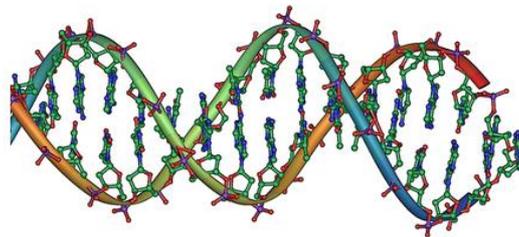
Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Revisión bibliográfica: Aplicaciones de la biología molecular en la práctica forense

Revisión bibliográfica: Aplicacións da bioloxía molecular na práctica forense

Literature review: Applications of molecular biology in forensic practice



Miriam Ferreiro Pantín

Junio, 2018



Departamento de Bioloxía

Facultade de Ciencias
Campus da Zapateira. 15071. A Coruña.
T 981 167 000 F 981 167 017
www.udc.es

TRABAJO FIN DE GRADO

D. Manuel Becerra Fernández, profesor Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña (UDC),

INFORMO:

Que el Trabajo Fin de Grado titulado: **Aplicaciones de la biología molecular en la práctica forense** presentado por la alumna Dña. **Miriam Ferreiro Pantín** ha sido realizado bajo mi dirección. Considerándolo finalizado, autorizo su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 20 de Junio de 2018

Fdo.: Manuel Becerra Fernández

Facultade de Ciencias
Campus da Zapateira. 15071. A Coruña.
T 981 167 000 F 981 167 017
www.udc.es

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	I
RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT.....	III
PALABRAS CLAVE/PALABRAS CHAVE/ KEYWORDS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
4. RESULTADOS.....	4
4.1. Recogida de muestras.....	4
4.2. Extracción de ADN.....	7
4.3. Cuantificación de ADN.....	8
4.4. Amplificación y detección de ADN.....	12
4.5. Pruebas forenses.....	13
4.5.1. STR (<i>Short Tandem Repeat</i>).....	14
4.5.2. SNP (<i>Single Nucleotid Polymorphism</i>).....	15
4.5.3. Indels.....	16
4.5.4. Marcadores de linaje.....	16
4.5.4.a ADN mitocondrial.....	17
4.5.4.b. Cromosoma Y.....	18
4.6. Interpretación de ADN.....	18
4.7. Problemas.....	19
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSION.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ALS	Fuentes de luz alternativas (<i>Alternative Light Sources</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
BSA	Albúmina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i>
CRS	Secuencia Referencia de Cambridge (<i>Cambridge Reference Sequence</i>)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DTT	1,4-ditiotreitol
EDNAP	Grupo Europeo de Perfilado de ADN (<i>European DNA Profiling Group</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENFSI	Red de Trabajo Europea de Institutos Científicos Europeos (<i>European Network of European Sciences Institute</i>)
FISH	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (<i>Fluorescence in situ Hybridation</i>)
FTA	Acuerdo de Tecnología Flinder (<i>Flinder Technology Agreement</i>)
HV	Región hiper Variable (<i>Hyper Variable Region</i>)
IISNP	Polimorfismo de un solo Nucleótido de Identificación Individual (<i>Individual Identification Single Nucleotide Polymorphism</i>)
INCIFOR	Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro"
Indel	Inserción-delección
IR	Infrarrojo
LCM	Microdisección por captura de láser (<i>Laser Capture Microdissection</i>)
LCN	Bajo Número de Copias (<i>Low Copy Number</i>)
MDA	Amplificación de Desplazamiento Múltiple (<i>Multiple Displacement Amplification</i>)
MIQE	Información Mínima para la Publicación de Experimentos con PCR cuantitativa a tiempo real (<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>)
nAu	Nanopartículas de oro
PAR	Región Pseudoautosómica (<i>Pseudoautosomical Region</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	PCR cuantitativa (<i>Quantitative PCR</i>)
RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RFU	Unidades de Fluorescencia Relativa (<i>Relative Fluorescence Units</i>)

SDS	Dodecilsulfato de sodio
SNP	Polimorfismo de un Solo Nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSR	Repetición de Secuencia Simple (<i>Simple Sequence Repeat</i>)
STR	Repeticiones Cortas en Tándem (<i>Short Tandem Repeats</i>)
UA	Umbral analítico
UE	Umbral estocástico
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
VNTR	Repeticiones en Tándem Variables en Número (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>)
WGA	Amplificación del Genoma Completo (<i>Whole Genome Amplification</i>)

RESUMEN

La Ciencia Forense es una disciplina que avanza conforme lo hace la biología. Los adelantos en genética y bioquímica molecular en las últimas décadas han permitido conocer más completamente el genoma humano y sus peculiaridades. Desde el momento de la comisión del crimen hasta la identificación del criminal, existen una serie de procesos directamente relacionados con el análisis del material hereditario. Este tipo de muestras permiten discriminar entre especies, individuos e incluso determinar la procedencia geográfica de los mismos, mediante una serie de procedimientos que irían desde la recolección de la prueba hasta la interpretación de la misma, pasando por la extracción del ADN, cuantificación, amplificación y detección. Por ello, la presente revisión bibliográfica tiene como objetivo revisar las técnicas más efectivas, a la par que innovadoras, que se emplearon y emplean en cada una de las mencionadas etapas, haciendo hincapié en las pruebas forenses más relevantes hasta la fecha: los polimorfismos. A pesar de que estos son capaces de discriminar entre individuos de manera casi inequívoca, es necesario establecer unos estándares y unas normas de manipulación para asegurar la obtención de resultados iguales, independientemente del laboratorio implicado en el análisis.

PALABRAS CLAVE: *PCR cuantitativa. STR. SNP. Marcadores de linaje. Análisis forense.*

RESUMO

A Ciencia Forense é unha disciplina que avanza conforme o fai a bioloxía. Os adiantos en xenética e bioquímica molecular nas últimas décadas permitiron coñecer máis completamente o xenoma humano e as súas peculiaridades. Desde o momento da comisión do crime ata a identificación do criminal, existen unha serie de procesos directamente relacionados coa análise do material hereditario. Este tipo de mostras permiten discriminar entre especies, individuos e mesmo determinar a procedencia xeográfica dos mesmos, mediante unha serie de procedementos que irían desde a recolección da proba ata a interpretación da mesma, pasando pola extracción do ADN, cuantificación, amplificación e detección. Por iso, a presente revisión bibliográfica ten como obxectivo revisar as técnicas máis efectivas, á vez que innovadoras, que se empregaron e empregan en cada unha das mencionadas etapas, facendo fincapé nas probas forenses máis relevantes ata a data: os polimorfismos. A pesar de que estes son capaces de discriminar entre individuos de maneira case inequívoca, é necesario establecer uns estándares e unhas normas de manipulación para asegurar a obtención de resultados iguais, independentemente do laboratorio implicado na análise.

PALABRAS CHAVE: *PCR cuantitativa. STR. SNP. Marcadores de linaxe. Análise forense.*

ABSTRACT

Forensic Science is a discipline that advances as biology does. Advances in genetics and molecular biochemistry in recent decades have allowed us to know more fully the human genome and its peculiarities. From the moment of commission of the crime to the identification of the crime, there is a series of processes related to the analysis of the hereditary material. This type of signals allows to discriminate between species, individuals and even determine the geographical origin of them, through a series of procedures that

go from the collection of the test to the interpretation of the same, going through the extraction of the DNA, quantification, amplification and detection. Therefore, this literature review aims to review the most effective techniques, at the same time innovative, which was used and are being using in each of the steps, emphasizing the most relevant tests up to the date: the polymorphisms. Although these can be discriminated between individuals in some unequivocal way, it is necessary to establish a standard to obtain the same results, regardless of the laboratory involved in the analysis.

KEYWORDS: *Quantitative PCR. STR. SNP. Lineage markers. Forensic analysis*

1. INTRODUCCIÓN

Se denominan Ciencias Forenses al conjunto de disciplinas que intentan resolver cuestiones legales basándose en el análisis científico de las pruebas halladas en el escenario de un crimen. Entre ellas se encuentran la biología y la criminalística, que avanzan por caminos separados hasta principios del siglo XX.

A pesar de que el primer tratado de Policía Científica, *"Il Giudice Criminalista"*, fue redactado por Antonio María Copsi ya en 1643, no fue hasta 1812 que fue fundada la *"Sureté Nationale"* francesa, el primer cuerpo de policía moderno (Figura 1). Un siglo después, en 1912, Hans Gross inauguró el Real e Imperial Instituto de Criminología de la Universidad de Graz a la par que publicaba *"Manual para un Juez de Instrucción"*, primer protocolo de recolección de pruebas.

En 1910, Edmond Locard establece los conocidos como "Principios de Locard", momento en el cual las dos disciplinas antes mencionadas se fusionan (Hombreiro, 2013).

Antes de que Watson & Crick describieran la estructura en doble hélice del ADN en 1953, se empleaba como método de análisis del material hereditario el suero sanguíneo. En 1900, Karl Landsteiner describió el sistema de clasificación sanguíneo ABO, lo que llevó a la posterior descripción de más marcadores presentes en la sangre.

Durante los 60 y los 70 del siglo XX se realizaron grandes avances en las técnicas moleculares que permitían ir describiendo el ADN y fue en 1980 cuando Wyman y White hallaron, por primera vez, un loci polimórfico en el mismo. Pero el punto de inflexión fue marcado por el descubrimiento, en 1984, de la técnica de la huella genética de ADN (*DNA fingerprint*), por Alec Jeffreys. La técnica empleada se denomina RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica) y se basa en el uso de enzimas de restricción que cortan regiones flanqueantes de polimorfismos VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*, Repeticiones en Tándem Variables en Número).

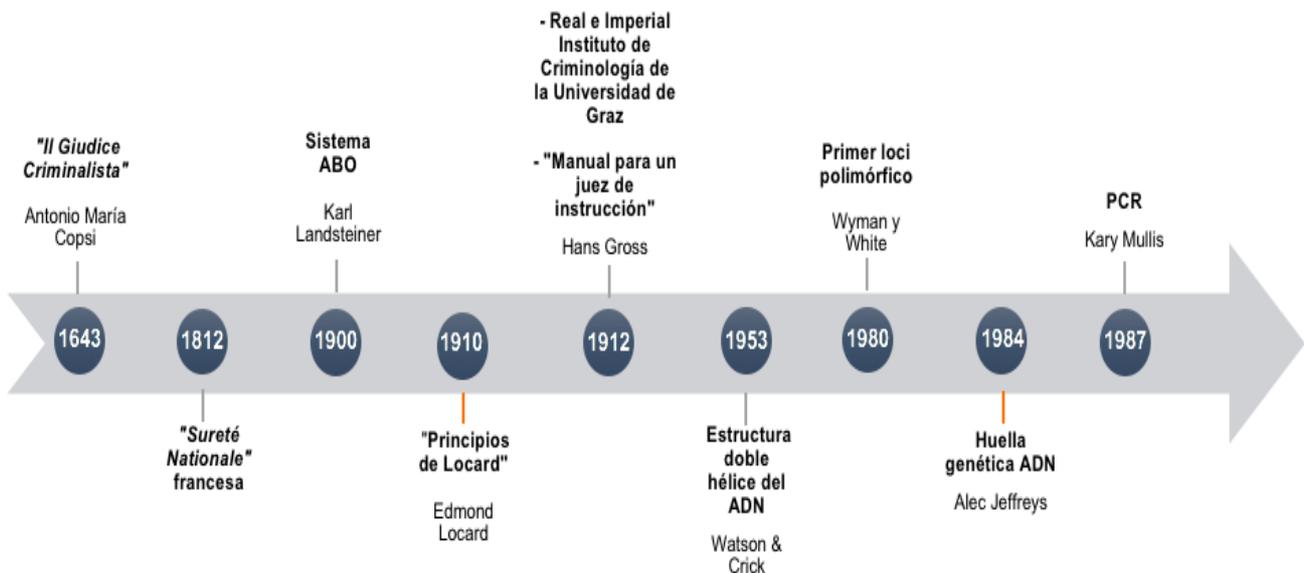


Figura 1. Línea de tiempo con los acontecimientos más importantes en las Ciencias Forenses. (Elaboración propia).

A partir de este hito, el crecimiento de la ciencia forense fue exponencial, ya que permitió observar la diversidad genética existente. Dos años más tarde, en 1986, se aplicó por primera vez la huella genética del ADN como prueba para la resolución de un crimen de violación en Reino Unido.



Figura 2. Procesos implicados en la generación de perfiles de ADN después de la comisión de un crimen. En rojo se encuentra el punto de Informe Pericial y la Evaluación estadística del perfil debido a que es un paso que no ocupa a la biología. (Elaboración propia a partir de Goodwin, Linacre & Hadi, 2011).

En 1987, Kary Mullis logró la amplificación de secuencias específicas de ADN mediante la técnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa), lo que le llevó a obtener el Premio Nobel de Química en 1993. El primer caso dónde se empleó fue en el análisis del antígeno (HLA)-DQ α , presente en un locus del leucocito humano.

Poco después ya se comenzaron a analizar STRs (*Short Tandem Repeats*, repeticiones cortas en tándem), que sustituyeron a los VNTRs y que continúan siendo comúnmente empleadas en este campo. En la actualidad se emplea la PCR junto con kits comerciales de amplificación de múltiples STR en las denominadas reacciones *multiplex*.

El uso de determinadas regiones del ADN como herramienta principal en la identificación y clasificación de individuos, tanto en la investigación forense, como en las pruebas genéticas de paternidad, se debe a la posibilidad del estudio de estas pequeñas regiones STRs, que mejoran los análisis estadísticos de manera muy significativa. Esta molécula es tan estable en el ambiente que ha permitido, incluso, tipificar el genoma completo de momias del Antiguo Egipto (Weedn & Roby, 1993).

Los errores en la caracterización solo pueden tener origen humano, de roturas en su estructura o de descuidos en el laboratorio. Debido a esto, la consideración del ADN como una prueba legal requiere una estandarización y el cumplimiento de unos protocolos que optimicen el éxito de su búsqueda, su análisis y su interpretación. Esto resulta complicado ya que su estudio engloba ciencias como la biología, la biotecnología y la genética. Por este motivo, no fue hasta 1989 que fue admitido como prueba forense en Estados Unidos.

Desde mediados de los 90 se utilizan bases de datos de manera internacional para archivar perfiles genéticos de criminales o sospechosos. Esto permite el intercambio de información útil en cuestiones legales entre países, facilitando mucho el trabajo a las fuerzas de seguridad. En España todos los Laboratorios Forenses se centran en, más o menos, 25 polimorfismos del ADN nuclear autosómico. En Europa,

el Tratado de Prum permite el intercambio de información de interés criminal cuando los delitos a investigar son graves (Hombreiro, 2013).

Los avances en otros métodos de tipificación que engloban polimorfismos presentes, de forma exclusiva, en el cromosoma Y o en el ADN mitocondrial permiten la caracterización de ADN presente en bajas cantidades o en condiciones subóptimas (ADN traza) y/o la separación efectiva de muestras que consisten en mezclas de material genético.

De hecho, el análisis de ADN traza se ha convertido en una parte fundamental del análisis forense actual. Con la llegada de la PCR y de los polimorfismos fue posible generar perfiles genéticos a partir de este tipo de muestras. Permitted obtener pruebas de objetos como armas, pelos o uñas (van Oorschot, Ballantyne, & Mitchell, 2010).

A pesar de los debates éticos, morales, jurídicos o religiosos que se han generado en torno a los nuevos descubrimientos en la genética, biología y tecnología; estas ciencias no han dejado de avanzar. Como consecuencia, se ha conseguido una optimización en la producción de resultados, que ahora tienen gran calidad y son obtenidos en periodos cortos de tiempo. Esto se ve claramente reflejado tanto en el progreso como en la evolución que se ha producido en las técnicas relacionadas con la ciencia forense desde su aparición.

Por último, tal y como se ilustra en la Figura 2, las funciones de la Biología y Genética Forense podrían resumirse en: recogida de evidencias, análisis de los polimorfismos genéticos, comparación y cotejo de los resultados con otras muestras, dependiendo de la finalidad, estudio estadístico del resultado y, por último, realización del Informe Pericial correspondiente (Hombreiro, 2013).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre las técnicas moleculares empleadas a lo largo de la historia de la ciencia forense, centrándose en las técnicas que actualmente engloban el análisis del ADN como método de discriminación entre individuos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica con el objetivo de obtener referencias sobre la metodología empleada en el análisis forense del ADN. Además de haber hecho uso de la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la UDC, se han realizado búsquedas en las siguientes bases de datos: Scopus (<https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>), Web Of Science (<https://login.webofknowledge.com/error/Error?PathInfo=%2F&Error=IPError>), PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y Google Scholar (<https://scholar.google.es/>). Entre las palabras clave empleadas en dicha búsqueda destacan: “ciencia forense/forensic science”, “análisis de ADN/DNA analysis” y “tipificado de ADN/DNA Typing”. La recolección se ha realizado desde noviembre de 2017 hasta abril de 2018.

4. RESULTADOS

4.1 RECOGIDA DE MUESTRAS

Son necesarias al menos 15 células para una óptima elaboración de perfiles genéticos. Cuanto peor sea el estado de la muestra recogida, mayor número de células se necesitarán para llevar a cabo un análisis satisfactorio, existiendo un límite (Goodwin, Linacre, & Hadi, 2011). Lo ideal sería recoger una cantidad de la misma que nos conceda cierto margen de error (Yarbrough, 1992).

Los 4 tipos principales de células nucleares que encontramos en las muestras son (Hombreiro, 2013):

- **Sangre.** Primero se procede a confirmar que la muestra sea sangre mediante ALS (*Alternative Light Sources*), como por ejemplo la luz IR (Infrarroja). Posteriormente, se trata de detectar el origen de la hemoglobina con técnicas inmunocitoquímicas. Por último, si es de origen humano, se procedería al análisis de ADN mediante el análisis de los leucocitos.
- **Células epiteliales.** Suelen encontrarse en condición de trazas. El desprendimiento de células de la piel por contacto con objetos, ropa u otros epitelios es elevado (aproximadamente 700 células por segundo). En condiciones ambientales ideales, estas células se conservarían 6 semanas.
- **Esperma.** Primero, se determina la existencia de semen mediante técnicas ALS con rayos UVA, ya que el plasma seminal se vuelve fluorescente bajo su incidencia. Posteriormente, se emplean enzimas (fosfatasa ácida) y el análisis de proteínas (factor proteico p30 humano) para determinar si el origen del esperma es humano. Después, se analiza la presencia o no de espermatozoides. No obstante, el interés de estas muestras subyace en las células no espermáticas nucleadas (leucocitos o células epiteliales).
- **Folículos capilares.** Después de determinar la especie de origen del mismo, que se puede realizar también mediante la observación del tallo (si existe), se pasaría a extraer el ADN. Este proceso solo será satisfactorio si el pelo se encuentra en su fase catagénica, sino no tendría ADN mitocondrial suficiente para realizar el análisis parental para los que se suele emplear.

No obstante, no son los únicos tipos de células nucleadas empleados, existen otros como:

- **Saliva.** Primero se identifica la mancha como saliva mediante técnicas de detección de la enzima amilasa. El ADN sería extraído de las células epiteliales de la boca.
- **Uñas.** Debido a su naturaleza queratinosa, durante la etapa de crecimiento de la misma aparecen células pre-queratinizadas, que son las que tienen interés analítico en este caso. Podrían contener, además, restos epiteliales de otros participantes en el crimen.
- **Orina y heces.** La orina es identificada por su alta cantidad en urea o creatinina y, las heces, son bacterias en un tercio de su peso. Ambas son poco interesantes por esas altas cantidades en flora bacteriana.

Dependiendo del estado de conservación del cadáver, se emplean unas u otras muestras para su identificación. Si este está en buen estado, se proceder a analizar su saliva o sangre; si está en un estado de descomposición avanzada, se pasa a las uñas y, por último, si su estado es de putrefacción, se lleva a cabo el análisis de huesos (a poder ser hematopoyéticos) o dientes (pupila dentina). Estos últimos están compuestos por hidroxapatita, que estabiliza el ADN permitiendo su análisis (Hombreiro, 2013).

A la hora de recoger las muestras, los técnicos deben tomar todas las medidas necesarias para evitar la contaminación de las mismas, que supondría un grave problema. Las condiciones de muestreo tienen que ser pulcras, minimizando la posible degradación o los errores posteriores en el análisis (Yarbrough, 1992). A continuación, se debe almacenar en condiciones que conserven, en mayor medida, el estado en el que se halló. Estas condiciones dependen del tipo de muestra.

Las muestras encontradas en el escenario criminal pueden ser ADN traza o incluso mezclas de varios genotipos. Por ello, cada vez están más en uso los kits de análisis multiplex, que permiten analizar varios polimorfismos a la vez en una única reacción de PCR. Gracias a esto, el análisis de ADN traza se ha vuelto muy relevante en los últimos tiempos.

Los métodos más empleados suelen ser la luz Polilight o el hisopo de algodón. El primero se basa en una fuente de luz que emite a longitudes de onda de entre 310 y 650 nm. Se trata de un método no invasivo y rápido, que detecta fluidos corporales como sangre o semen. No obstante se requiere investigación adicional (Vandenberg & Van Oorschot, 2006). El segundo se lleva a cabo mediante la rotación del algodón humedecido (normalmente con agua) sobre el área de interés. Es importante que el hisopo no se seque, para facilitar los análisis posteriores (van Oorschot et al., 2010).

El muestreo de la zona de interés se puede llevar a cabo tanto con técnicas químicas como físicas. Normalmente, para sangre, saliva o semen, se realiza primero un test presuntivo y, posteriormente, solo en el caso de un crimen grave, un test confirmativo (Goodwin et al., 2011). Lo ideal sería que el propio test sea confirmativo, no destructivo y aplicable a múltiples fluidos.

Un ejemplo es el espectrofotómetro de Raman (Figura 3). Esta técnica tiene una gran capacidad discriminante entre distintos fluidos corporales y podría suponer la clave para el análisis correcto de muestras con mezclas (ya sean líquidas, sólidas o gaseosas). Por esto y porque emplea un láser no destructivo de

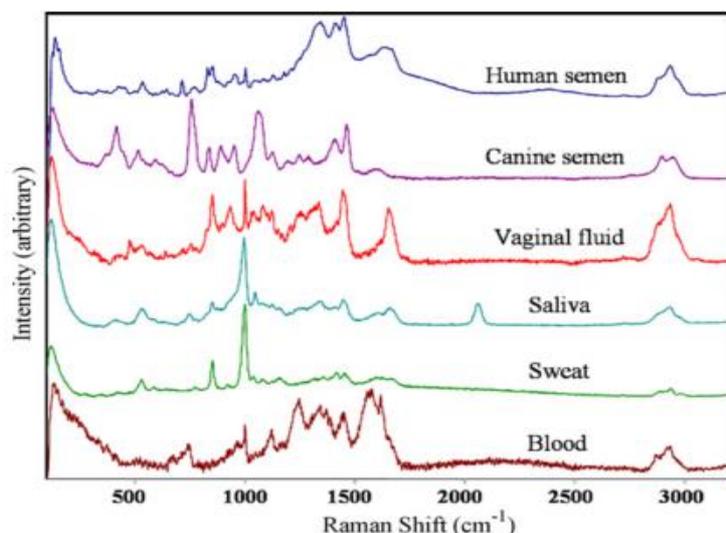


Figura 3. Espectro de Raman de semen humano, semen canino, fluido vaginal, saliva, sudor y sangre, excitados a 785nm. Este es un ejemplo de test no destructivo y altamente específico, dando un único espectro para cada fluido corporal. Cada espectro produce unos picos característicos correspondientes con diferentes compuestos hallados en cada tipo de fluido y que son específicos de los mismos. (Extraído de Virkler & Lednev, 2009).

baja intensidad, es por lo que se considera una técnica consultiva de alta especificidad y no destructiva. No se necesita preparación previa de la muestra y bastaría con picogramos o femtolitros de la misma (Virkler & Lednev, 2009).

Pero, en los últimos años, la técnica de microdissección por captura láser (LCM, *Laser Capture Microdissection*) ha sido la más utilizada. Aunque en un primer momento fue diseñada para el aislamiento de células tumorales (Budimlija et al., 2005), esta técnica física de separación celular es actualmente usada para facilitar la correcta interpretación de muestras que contienen mezclas de genotipos (Figura 4). Combina la instrumentación de la luz UV microscópica con la tecnología láser, permitiendo marcar tipos celulares o regiones de tejido para su correcta separación y posterior análisis (Vandewoestyne & Deforce, 2010). Las células son visualizadas en un ordenador y, posteriormente, se produce una ablación por láser de las células diana de interés que se recogen para su posterior procesamiento en la PCR (Sanders, Sanchez, Ballantyne, & Peterson, 2006).

Esta técnica es muy útil en crímenes de asalto sexual. Normalmente interesa aislar las células espermáticas de manera precisa de las células epiteliales de la víctima. Con los marcadores específicos de membrana esto a veces no era posible. De esta manera, primero se marcan las células mediante FISH (*Fluorescence in situ Hybridation*, hibridación fluorescente *in situ*) y, posteriormente se procede a la separación de las células de la víctima y del agresor (Figura 4), facilitando el posterior análisis del material genético para su tipificación. Además, es una técnica sencilla y permite también analizar ADN traza (Sanders et al., 2006).

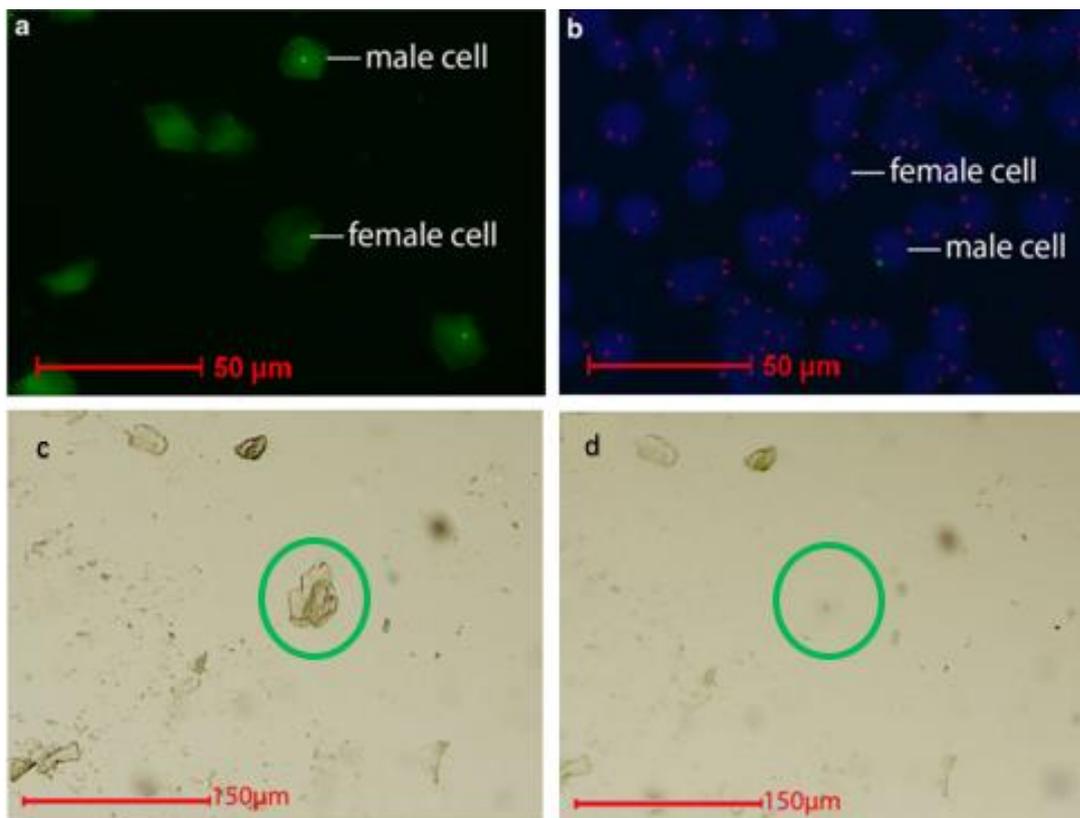


Figura 4. FISH (a,b) y LCM (c,d). **a.** Células fluorescentes después de la aplicación de técnica FISH específica de cromosoma Y aplicadas a células bucales de hombre (puntos verdes) y mujer. **b.** Imagen fluorescente de linfocitos después de aplicar una FISH específica de cromosoma Y (puntos verdes) y cromosoma X (puntos rojos). **c.** Preparación celular antes de realizar la LCM sobre el agregado de células del centro (circunferencia verde). **d.** Vista de la preparación celular posterior a la LCM sobre el agregado de células central (circunferencia verde). (Extraído de Vandewoestyne & Deforce, 2010).

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

El proceso de extracción de ADN tiene como objetivo principal obtener, de una muestra biológica, material genético lo suficientemente puro como para permitir su máxima amplificación. Se debe seleccionar el método en base al tipo de muestra, la velocidad a la que será posible hacer la extracción, los químicos que se usarán y la experiencia del personal de laboratorio. Se podría resumir en tres fases: lisis celular, desnaturalización proteica y separación ADN-proteína.

A pesar de la toxicidad del fenol, hasta mediados de los años 90 se empleó la técnica orgánica de extracción basada en el fenol cloroformo. Este compuesto se añade cuando ya se ha producido la lisis mediante la adición de SDS (dodecilsulfato de sodio) y proteinasa K. Entonces, el fenol desnaturaliza las proteínas, separándolas del ADN. Se obtiene un producto muy puro, pero eran necesarios muchos tubos de centrifugación (Figura 5).

Otro de los primeros métodos empleados fueron los basados en las resinas quelantes, como Chelex 100. Está compuesta por copolímeros de estireno-divinilbenceno que, al contener iones iminodioacetato, actúa como quelante de magnesio o de otros metales polivalentes (con gran afinidad por el ADN), eliminándolos de la solución. No genera un producto muy puro, pero sí lo suficiente como para establecer perfiles genéticos (Figura 5). Es una técnica fácil, rápida y barata.

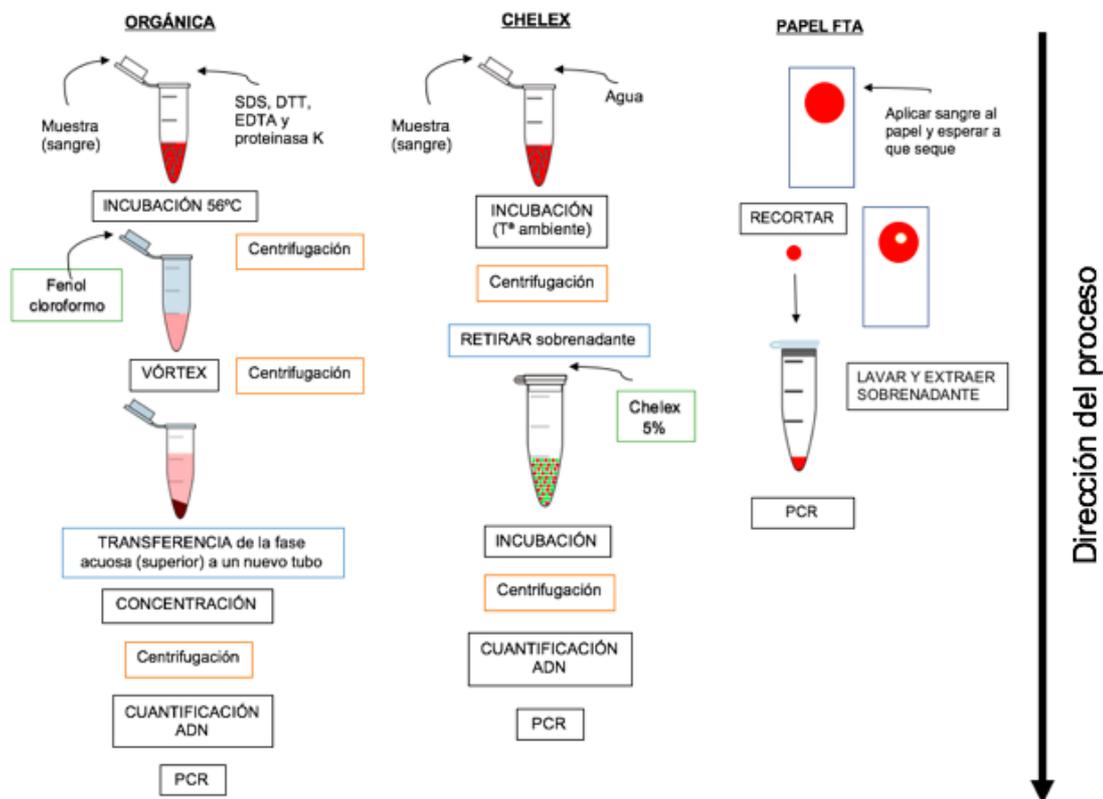


Figura 5. Esquema de los principales métodos implicados en la extracción de ADN. (Elaboración propia).

El papel FTA (*Flinder Technology Agreement*) supone otra técnica para la extracción del ADN de muestras de fluidos corporales. Consiste en una tarjeta de papel de celulosa absorbente impregnada con químicos que producen la lisis celular e inhiben el crecimiento de microorganismos, permitiendo la conservación del material genético durante años y a temperatura ambiente. Una vez colocada la muestra se retira una pequeña parte del papel y se introduce en un tubo para su lavado. Cuando se finaliza este

proceso, ya estaría preparado para introducirlo en la PCR (Figura 5). Sus resultados son muy consistentes sin la necesidad de cuantificación. No obstante, este método no se emplea hoy en día debido a la imposibilidad de usarlo para obtener varios perfiles en una sola reacción.

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de las extracciones de ADN se han implementado, en las últimas décadas, varias formas de extracción de la fase sólida de las muestras biológicas. Estas permiten que el ADN se una a un sustrato que, más tarde, se eliminará con métodos de purificación. Es muy común recurrir a la precipitación de sales, como ocurre en las extracciones basadas en geles de sílice, que constituyen una amplia mayoría. Para ello se suelen emplear kits comerciales como las columnas QIAamp. La lisis se produce incubando la muestra con un buffer de lisis (que contiene detergente y una proteinasa K) y, mediante la adición de una sal caotrópica (como el hidrocloreuro de guanidina), se rompe la estructura proteica, volviéndose estas insolubles. Esto permitirá una correcta separación del ADN y de las proteínas después de la centrifugación. Se obtendrá un ADN muy limpio, pero es más lento que las resinas quelantes (Goodwin et al., 2011).

Uno de los últimos avances en este campo fue el desarrollo del kit PrepFiler, en 2008. Este permite realizar la extracción de ADN de muestras biológicas mediante la unión del mismo con partículas magnéticas. Después, esa agregación se revierte empleando un tampón de elución. Esta técnica da lugar a altos rendimientos con grandes o pequeñas cantidades de muestra. El ADN resultante está libre de inhibidores de PCR detectables y, además, es un kit susceptible de automatización (Brevnov et al., 2009).

No obstante, existen variantes en estos protocolos. En muestras de semen, será necesario añadir DTT a la muestra para romper los puentes disulfuro del acrosoma y fomentar la liberación espermática. En el caso de muestras duras, como dientes o huesos, es necesaria la descontaminación previa mediante abrasión, detergentes o rayos UVA para, más tarde, decalcificarlas con tampón EDTA (Goodwin et al., 2011).

A la hora de realizar la extracción es importante intentar minimizar los problemas posteriores que impliquen la degradación del ADN o la inhibición de la PCR, ya que supondría el fallo o la reducción en el rendimiento en los siguientes procesos. Estas inhibiciones consisten, por ejemplo, en la unión en el centro activo de la *Taq* polimerasa de moléculas como la hemoglobina, o de otros agentes, como el tinte del tejido vaquero (Butler, 2009).

4.3 CUANTIFICACIÓN ADN

Después de la extracción del material genético, se procederá a su cuantificación, cuya finalidad es conocer la cantidad de ADN que se ha aislado. Además, se hace porque la muestra biológica de la que procede podría tener otro tipo de ADN no humano. Sería necesario, por tanto, aislar el ADN humano y conocer la cantidad de la que se dispone (Butler, 2009). Para ello existen técnicas específicas, como el kit Quantiblot o la hibridación con la secuencia *Alu*, de las que se hablará más adelante.

Existen reglas que regulan este proceso en países como E.E.U.U. En condiciones normales, el ADN humano que existe en una muestra es muy bajo y difícilmente cuantificable, ya que las condiciones en las que se halla no suelen ser prístinas, conservándose pocas células nucleadas (Goodwin et al., 2011). Se suele emplear sólo una parte del ADN extraído para la amplificación, ya sea por no querer concentrar la

muestra en el laboratorio y/o por el deseo de quedarse parte de la muestra para futuros usos (van Oorschot et al., 2010).

Algunas de las técnicas empleadas son:

- Visualización en gel de agarosa. La agarosa es un polímero que se puede verter de varias maneras en un gel. Este gel se sumerge en buffer de electroforesis y la solución con la muestra de ADN es colocada en pocillos, formados en el propio gel con un peine. Una corriente eléctrica atraviesa el gel y el ADN, cargado negativamente, migra hacia el ánodo. Este gel forma una matriz porosa y las moléculas de ADN se mueven más rápido por él cuanto más pequeñas sean (Figura 6). Los minigeles de 10 cm son suficientes para el ADN. Se le puede añadir tintes al gel, como el bromuro de etidio o el DAPI, pudiendo visualizar el ADN y cuantificarlo. Suele llevar a una sobreestimación.

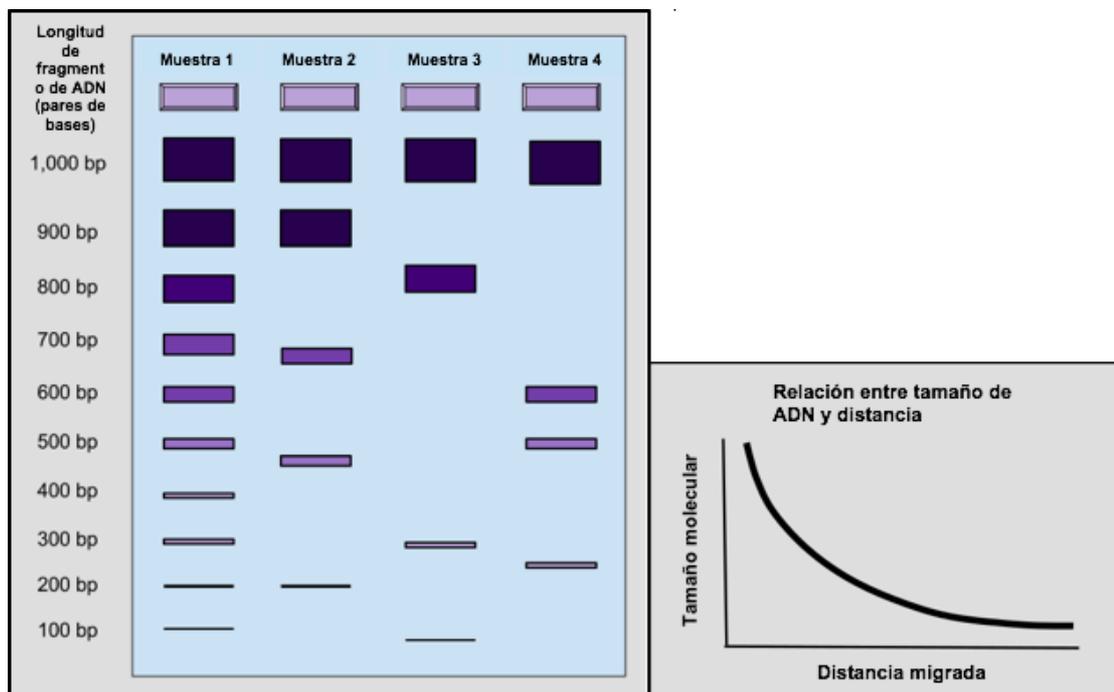


Figura 6. Esquema de la electroforesis en gel de agarosa en la que el ADN migra más o menos distancia según su tamaño. En la primera imagen a la izquierda (Muestra 1) se encuentra el marcador que se usará como referencia para comparar las distancias migradas (Muestras 2, 3 y 4) y poder obtener el tamaño del fragmento en cuestión. De esta manera, el ADN más pequeño migra más, por lo que la curva de relación entre ambas variables es exponencial pero negativa (Editado a partir de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gel_Electrophoresis.svg)

- Espectrofotometría ultravioleta. Debido a que el ADN absorbe luz en un máximo de longitud de onda de 260nm, se puede estimar la concentración del mismo aplicando un rango de 220 y 300nm. Se vierte la muestra en una cubeta de cuarzo y la luz la atraviesa, midiendo la absorbancia (Abs) frente a un estándar previamente definido. Si el ADN es puro, el ratio de Abs entre 260nm y 280nm debería estar entre 1.8 y 2.0 (Figura 7). No se suele emplear en análisis forense porque no permite la detección satisfactoria de ADN traza.
- Espectrofotometría fluorescente. Es una alternativa a la anterior. Se emplean lectores fluorescentes de microplaca. Un ejemplo es el uso de la sonda fluorescente PicoGreen, específica del ADN de doble hélice y capaz de detectar

hasta 25pg/mL. Al unirse al ADN, su fluorescencia aumenta considerablemente. Es una técnica muy sensible y poderosa, no obstante, no es específica de humanos.

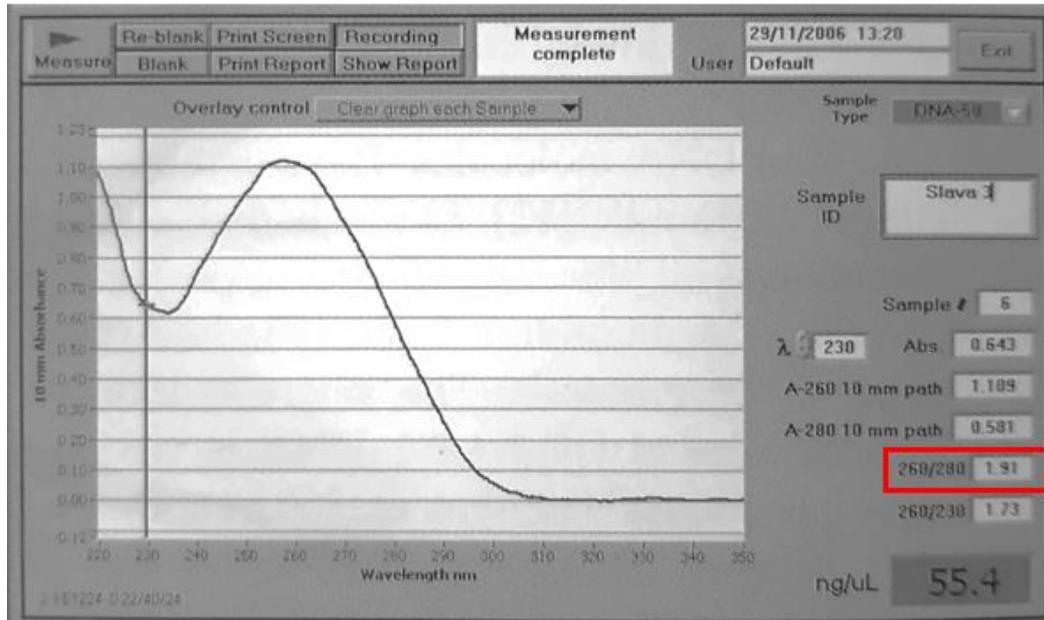


Figura 7. Absorbancia máxima del ADN con 260nm observada mediante un software después de la espectrofotometría ultravioleta. El ratio 260/280 (rectángulo rojo) 1.91 nos indica que el extracto de ADN analizado es puro (Editado a partir de Goodwin et al. 2011).

- Hibridación. Técnica muy usada desde los 90, existiendo ya kits comerciales como el Quantblot. El material genético extraído es puesto en una membrana de nylon cargada positivamente mediante slot o dot blot y, después, es expuesta a una sonda específica de humanos. Normalmente, se usa el satélite α D17S1, que se encuentra en el cromosoma 17. A su vez, se puede unir con algún material colorimétrico o con un componente quimioluminiscente. Se aplican una serie de estándares sobre la membrana para poder comparar la señal de ADN extraído y cuantificarlo. Tiene una alta especificidad, no obstante, la sensibilidad es limitada y conlleva mucho tiempo de trabajo. Ha sido reemplazada por la PCR real-time.

En la actualidad, el método más empleado es la PCR real-time, por eso las cuantificaciones se realizan con vistas a optimizar el proceso de PCR, ya que sus resultados serán óptimos cuando lo sea la concentración de ADN añadida.

La PCR real-time o PCR cuantitativa (qPCR) consiste en monitorizar la generación de productos en la PCR después de cada ciclo de replicación. Esta técnica puede ser diseñada para obtener genotipos específicos siendo capaz de detectar una sola copia del ADN objetivo. Además, sus protocolos no son tediosos, son susceptibles de automatización y se permite trabajar con reacciones multiplex, haciendo posible la cuantificación de varias muestras a la vez (Swango, Timken, Chong, & Buoncristiani, 2006). La PCR ha pasado de ser una técnica lenta basada en gel, cualitativa y de bajo rendimiento en sus inicios a ser una referencia para la detección y cuantificación de ADN y ARN mediante la qPCR (Bustin, 2010).

En un primer momento, se empleaba el bromuro de etidio de manera que, cuánto más productos se generaban, más etidio se intercalaba con el ADN de doble hélice, generando fluorescencia bajo rayos ultravioleta. Para aumentar la sensibilidad de la técnica se comenzó a usar SYBR Verde y el sistema TaqMan (Figura 8).

Usando el verde SYBR el componente fluorescente se une a la doble hélice de ADN y aumenta la fluorescencia del mismo generada bajo rayos UV. Con el sistema TaqMan (Figura 8) se emplean 2 cebadores y 1 sonda que hibrida con la región amplificada del ADN. Cuando el cebador coincide con la sonda, la actividad 5'-exonucleasa de la *Taq* polimerasa la degrada, liberando el producto. Cuantos más productos se generan, más moléculas fluorescentes habrá en la muestra (Figura 9) (Goodwin et al. 2011). La qPCR TaqMan permite conocer de manera rápida y fiable cantidades relativas de ADN humano masculino en comparación con el ADN humano femenino en una muestra. Para ello se emplean sondas que hibriden con zonas de los cromosomas específicas de humanos (como la secuencia *Alu*) y del cromosoma Y (como la secuencia *DYZ5*) en una reacción dúplex. Para visualizar los resultados se corren los productos de la qPCR mediante electroforesis en gel de agarosa (Nicklas & Buel, 2006).

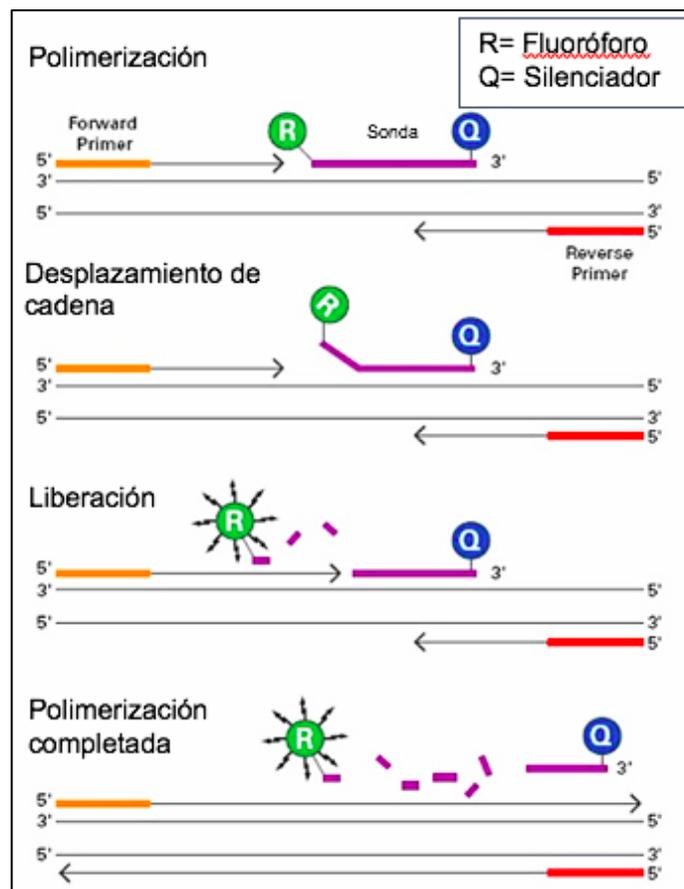


Figura 8. Mecanismo de una sonda TaqMan (Editada a partir de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TaqMan_GX_cartoon.jpg)

No obstante, el ser una técnica con un protocolo tan simple y no tener unos estándares bien definidos ha llegado a impedir que fuese considerado un método preciso y fiable por la comunidad científica. Por ello, en 2009 ha entrado en vigor la guía de Información Mínima para la Publicación de Experimentos Cuantitativos con PCR real-time (MIQE, *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*). Esta consiste en una serie de pautas que buscan la fiabilidad en la literatura científica y un consenso entre laboratorios, obteniendo con ello una transparencia que permita reproducir los experimentos en cualquier centro de trabajo (Bustin et al., 2009).

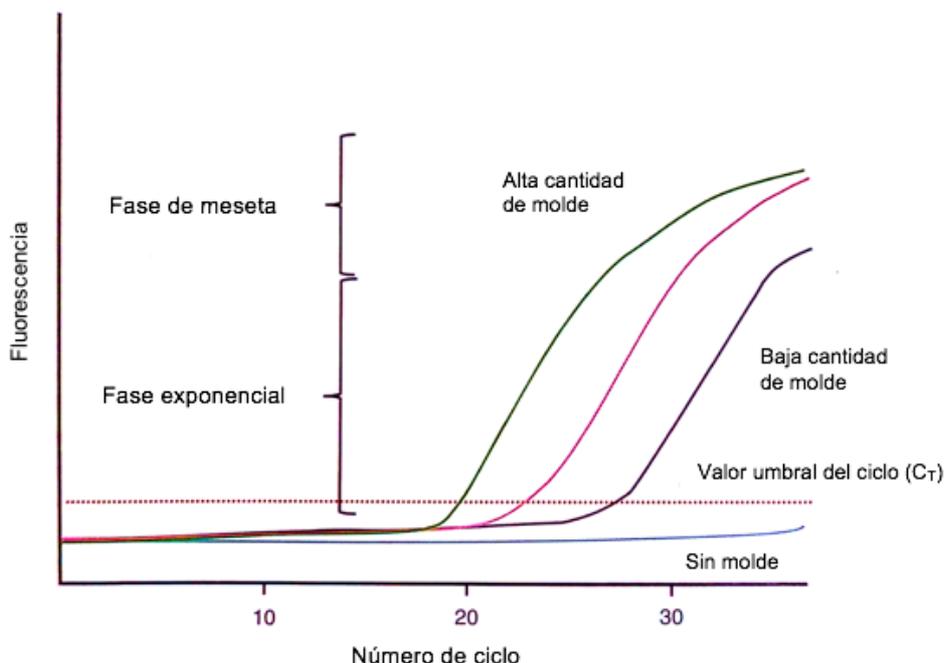


Figura 9. Cuantificación con PCR real-time (qPCR). La figura muestra el resultado de la prueba sobre 4 muestras con concentraciones diferentes de molde (región susceptible de amplificar): alta (verde), media (rosa), baja (violeta) y sin molde (azul). A medida que aumenta la fluorescencia generada con el avance de los ciclos, entrará en una fase exponencial y, cuando los reactivos se agotan, se entrará en una fase de meseta. El valor umbral del ciclo (C_T) establece el punto en donde la reacción entra en la fase exponencial. Será en un número de ciclo diferente según la cantidad de molde. (Editada a partir de Goodwin et al. 2011)

4.4 AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE ADN

La amplificación constituye el principal punto de control de calidad del proceso, pudiendo ser llevado a cabo por los biólogos forenses. La técnica más usada es la PCR. Se trata de un proceso enzimático en el cual se replica, una y otra vez, una región específica de una secuencia de ADN, dando lugar a amplicones. Es un método sensible, rápido y que no se ve limitado por la calidad del ADN, ya que también se emplea para amplificar ADN traza en el conocido como análisis LCN (*Low Copy Number*) (Butler, 2009). Este último se basa en el aumento del número de ciclos PCR hasta un máximo de 60 y se suele emplear para la tipificación de ADN antiguo o muy degradado (van Oorschot et al. 2010).

El volumen de muestra total empleada suele ser entre 20 y 50 μL , no obstante, puede variar entre 5 y 100 μL . Por debajo del límite habría problemas relacionados con la dificultad para manipular dicha muestra y, por encima, el problema estaría en el equilibrio térmico, ya que se tardaría mucho más en transmitir un cambio de temperatura (Butler, 2009). Si la PCR es totalmente eficiente, después de 32 ciclos de amplificación se obtienen hasta 1 billón de copias del amplicón.

Los componentes más importantes de esta reacción son los dos cebadores, que flanquean la región a amplificar y se crean mediante softwares como Oligo (<http://www.oligo.net/>) o Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). También es esencial añadir cloruro de magnesio (u otra sal con capacidad estabilizadora), cuatro nucleótidos trifosfato (en igual concentración) y un tampón, que ayude a mantener las condiciones de pH óptimas. Por último, se necesita una ADN polimerasa termoestable. La primera utilizada fue una polimerasa aislada de *Escherichia coli*, que necesitaba ser repuesta tras cada ciclo de amplificación. Por ello fue sustituida, más tarde, por otra obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, más conocida como *Taq* polimerasa. Sobre la misma se han

realizado modificaciones creando la AmpliTaq Gold polimerasa, que actúa solamente después de ser activada mediante su incubación a 95°C durante 10 minutos. Esto evita la unión no específica a productos no empleados en la PCR (Goodwin et al., 2011).

Actualmente, la PCR ha sido simplificada mediante la utilización de kits que contienen todo lo necesario para llevar a cabo la amplificación y que solo necesitan ser añadidos a una alícuota de ADN. No obstante, a pesar del desarrollo de estas facilidades, siguen siendo necesarios los protocolos de control pre-PCR y post-PCR con el fin de prevenir la contaminación de la muestra o del producto obtenido.

Para llevar a cabo la PCR se emplean termocicladores, siendo el más común GeneAmp 9700. No obstante, esta tecnología ha avanzado hasta el punto de ser posible amplificar 768 muestras a la vez en dos bloques de 384. También es posible realizar la amplificación simultánea de 20 o más regiones de ADN en las PCR multiplex. En estas reacciones, los cebadores tienen que ser compatibles, es decir, tener una temperatura de anillamiento similar y carecer de regiones complementarias en abundancia, por lo que es necesaria una extrema optimización para la obtención de buenos resultados (Butler, 2009).

Otra variante de esta técnica es la Amplificación del Genoma Completo (WGA, *Whole Genome Amplification*). Mediante este método se realiza la amplificación de todo el genoma empleando cebadores aleatorios. Se emplea la ADN polimerasa del fago $\Phi 29$, que trabaja por amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, *Multiple Displacement Amplification*). Es un método isotérmico (a 30°C), por tanto, la muestra no requiere ser tratada con calor y frío como en la PCR tradicional (Jiang, Zhang, Deka, & Jin, 2005). Un avance muy reciente ha sido el descubrimiento de polimerasas capaces de pasar por alto errores en el ADN dañado que la *Taq* polimerasa no podía ignorar y, por ello, no trabajaba bien en ese tipo de muestras (McDonald et al., 2006).

Con la técnica de la PCR es posible detectar y medir los amplicones producidos durante la misma. Primero, se suele emplear la electroforesis capilar para separar las distintas moléculas de ADN de entre 20 y 500 nt sobre las que después se aplica un tinte fluorescente, que se unen al extremo 5' del cebador. Durante este proceso, un láser atraviesa una pequeña ventana de cristal y los productos unidos al fluorescente son excitados, emitiendo fluorescencia. Una cámara la detecta y se registra en el software. Después de esto se realiza la PCR.

La altura de los picos es la medida de la fluorescencia en Unidades Relativas de Fluorescencia (*RFU, Relative Fluorescence Units*). Como estándar se emplea una muestra que contiene fragmentos de ADN de longitud conocida (medida con Southern blot), y que se coloca en el carril interno de la misma electroforesis. El resultado final es un electroferograma con picos que representan alelos (Goodwin et al., 2011).

Las nuevas tecnologías, como el uso de nanopartículas de oro (nAu) a modo de etiquetado, aumentan considerablemente la sensibilidad. Esto permitiría detectar el ADN directamente sin la necesidad de realizar una amplificación por PCR (Lee, McCord, & Buel, 2014).

4.5 PRUEBAS FORENSES

Los marcadores genéticos empleados como pruebas forenses deben ser altamente polimórficos y de fácil localización y caracterización, ya que tienen que dar lugar a perfiles

simples, tanto de interpretar como de comparar, entre distintos laboratorios. Por otra parte, no deben estar bajo presión selectiva, teniendo también una baja tasa de mutación.

Los polimorfismos tienen su base en la cantidad de copias del fragmento repetido, que puede variar entre la población, permitiendo la discriminación entre individuos. Así, analizando múltiples loci, la combinación de polimorfismos es única en cada persona.

Los principales polimorfismos que cumplen estos requisitos y que se emplean actualmente son los STR y, de manera menos evidente, los SNP (*Single Nucleotid Polymorphism*, Polimorfismos de un Solo Nucleótido). Por otra parte, se suelen analizar también los polimorfismos encontrados tanto en el ADN mitocondrial (ADNmt) como en el cromosoma Y (STR-Y), que son denominados como marcadores de linaje, pero que tienen un uso más especializado.

4.5.1. STR (Short Tandem Repeat)

También llamados microsátélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*), son secuencias cortas de ADN, de entre 2 y 6 pares de bases (pb) de longitud, que se repiten un gran número de veces de manera consecutiva (Figura 10). Debido a que las regiones flanqueantes (las secuencias inmediatamente anterior y posterior al polimorfismo) de los STR son idénticas en todos los seres humanos, son fácilmente localizables con cebadores de secuencias específicas. Su análisis mediante PCR se trata del método más comúnmente empleado para realizar la tipificación del ADN y constituyen un método muy confiable para la identificación individual.

Los STR pueden clasificarse según su composición pudiendo ser simples, si solo tienen un tipo de repetición de igual secuencia y longitud; compuestos, si tienen dos o más repeticiones simples adyacentes; o complejos, si contienen varios tipos de repeticiones con diferentes longitudes y secuencias (Figura 10).

Cuántos más STR se analicen en una reacción de PCR, mayor será la capacidad de discriminación entre individuos. Para explotar esto, las casas comerciales han desarrollado kits de amplificación que contienen hasta 25 STR diferentes y estandarizados por el sistema informático CODIS (*Combined DNA Index System*). Son los denominados kit multiplex y suelen contener locus de discriminación sexual, como es el caso del gen Amelogenina.

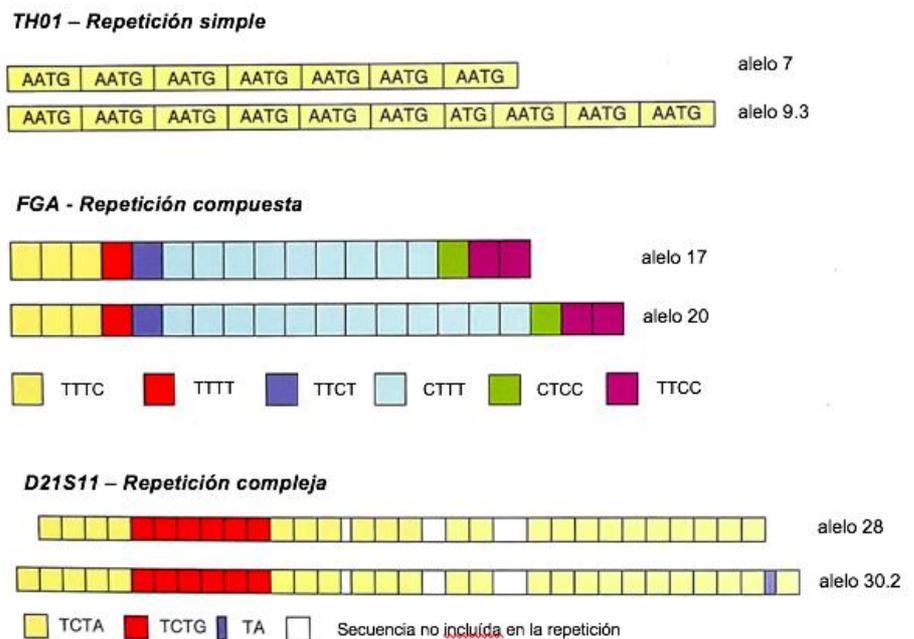


Figura 10. Estructura de tres loci STR de uso común: TH01, FGA y D21S11. El TH01 es un locus con repeticiones simples. El locus FGA es compuesto. Por último, el D21S11 es complejo (Editada a partir de Goodwin et al., 2011).

El gen Amelogenina codifica para una proteína presente en el esmalte dental. La peculiaridad de este es que presenta una deleción de 6 pb en el cromosoma X, lo que permite distinguir entre sexos. Mediante un electroferograma, que consiste en un gráfico que nos muestra la cantidad de fluorescencia emitida en función del peso molecular, podremos saber si nos encontramos ante un individuo XX o XY (Figura 11).

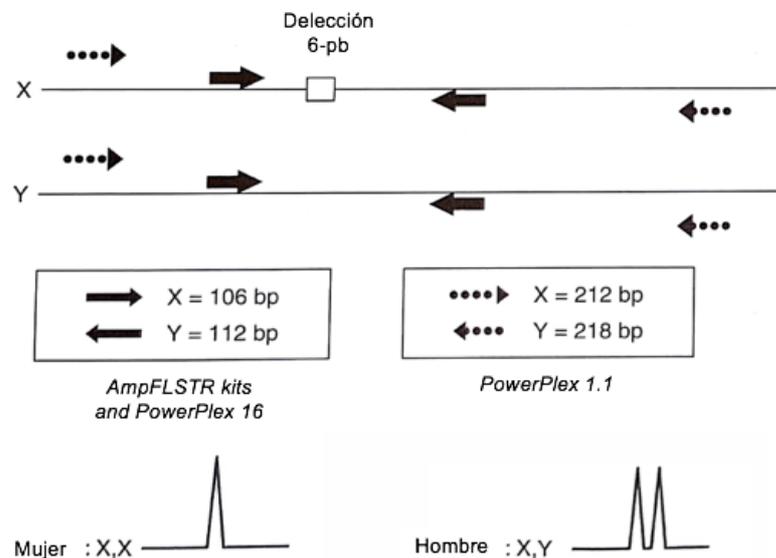


Figura 11. Esquema del tipificado del gen amelogenina. Los kits de cebadores representados tienen como objetivo detectar la deleción de 6pb del cromosoma X. Si el resultado del análisis es de un pico, será una muestra de mujer; si el resultado son dos picos, la muestra pertenece a un hombre (Editada a partir de Butler, 2010).

La Red Europea de Institutos de Ciencias Forenses (ENFSI, *European Network of European Sciences Institute*) y el Grupo Europeo de Perfiles de ADN (EDNAP, *European DNA Profiling Group*) han establecido estándares para facilitar el intercambio de información entre laboratorios de distintos países. Además, decidieron introducir los kits miniSTRs para incrementar la sensibilidad y fiabilidad del tipificado (Gill, Fereday, Morling, & Schneider, 2006). Estos kits emplean un tamaño de amplicón más pequeño (60-130 pb), que permite analizar muestras altamente degradadas o que se encuentran en muy baja cantidad (Kidd et al., 2006)

4.5.2. SNP (Single Nucleotid Polymorphism)

Variación de un solo sitio (1pb) en la secuencia de ADN entre distintos individuos (Figura 12). Hay millones de SNP por individuo, por lo que tienen un gran potencial discriminatorio. Se identificaron como resultado del Proyecto Genoma Humano. Se detectan de la misma forma que los STRs, por extensión con cebadores específicos, pudiendo detectar múltiples de manera simultánea. Estos polimorfismos suponen la mayoría de diferencias fenotípicas observables entre individuos. Se establecen en el genoma como mutaciones puntuales que confirieron cierta ventaja a los individuos portadores, o que simplemente no causaron desventaja.

Actualmente se utilizan más que los STRs por su tasa 0 de mutación, su potencial tipificación automatizada de manera muy precisa, su tamaño de amplicón, que es incluso menor que en los miniSTRs (45-55 pb), y por la posibilidad de multiplexarse, aumentando así la velocidad de tipificación. No obstante, también presenta problemas, ya que no

detecta mezclas de manera fiable y pueden presentar una gran variación entre la población en sus frecuencias alélicas (Kidd et al., 2006).

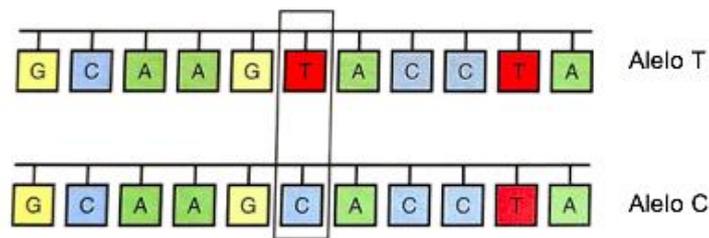


Figura 12. SNP en el que la diferencia entre alelos radica en una transición del nucleótido de timina (T) por uno de citosina (C) (pirimidina intercambiada por otra pirimidina). Esto ocurre durante la replicación del ADN en la meiosis (Editada a partir de Goodwin et al., 2011).

Se han desarrollado 92 SNP para la identificación individual (IISNP, *Individual Identification Single Nucleotid Polymorphism*) de los cuales 45 son autosómicos y permiten disminuir la probabilidad de que dos individuos que se encuentren en cualquier parte del mundo tengan genotipos idénticos. Esto permite la identificación del origen geográfico del portador de esos polimorfismos (Pakstis et al., 2010). Estudios recientes han concluido que con 14 SNPs sería suficiente para discriminar entre individuos europeos, asiáticos orientales y africanos (Rogalla, Rychlicka, Derenko, Malyarchuk, & Grzybowski, 2014).

En el Instituto de Ciencias Forenses “Luis Concheiro” (INCIFOR) se emplean 52 SNPs autosómicos para complementar el análisis STR de ADN degradado. Por otra parte, se emplean 34 SNPs para determinar el origen geográfico de la muestra analizada, pudiendo distinguir entre africano, asiático o europeo. Existen multiplexes específicos de otras localizaciones geográficas como el PYMA para americanos nativos o el PACIPLEX para aborígenes del Pacífico (Instituto de Ciencias Forenses “Luis Concheiro”, 2016).

4.5.3. INDELS

Inserciones o deleciones de uno o varios nucleótidos que permiten diferenciar entre individuos. Salvo que sean múltiplo de 3, las indels modifican el marco de lectura del ADN. Se emplean para la identificación humana, teniendo una eficiencia similar a los miniSTRs (Gettings, Kiesler, & Vallone, 2015)

Se ha demostrado que mediante el análisis de 38 indels autosómicas se puede diferenciar entre africanos, europeos y asiáticos (Pereira et al., 2009). Además, existen kits multiplexes (IrisPlex) que permiten predecir de manera precisa la procedencia de los individuos europeos según sus ojos sean de color azul o marrón. Esto se ha conseguido gracias a la existencia de EUREYE, una base de datos con información de las ascendencias biológicas de los individuos de siete países europeos, entre ellos España (Walsh et al., 2012).

4.5.4. MARCADORES DE LINAJE

Aunque sea limitado, el análisis de polimorfismos presentes en el ADNmt y el cromosoma Y tienen alto poder discriminante, pudiéndose utilizar cuando el análisis de otros polimorfismos no resulta satisfactorio.

4.5.4.a. ADN mitocondrial

Este tipo de ADN, transferido por herencia materna, presenta una alta tasa de mutación debido a la exposición a especies tóxicas de oxígeno activo producidas durante la fosforilación oxidativa. En ciencia forense las zonas susceptibles de estudio son las regiones hipervariables I y II (HV-I/II, *Hyper Variable Region I/II*). Existe una tercera HV, pero no se suele emplear (Figura 13). Las mutaciones en estas regiones son más frecuentes ya que se encuentran en la región control (no codificante) y se transfieren de madres a hijos con una frecuencia de 1 cada 40 eventos. Se emplean cuando el ADN es de baja cantidad o se encuentra altamente degradado, ya que existe un gran número de copias.

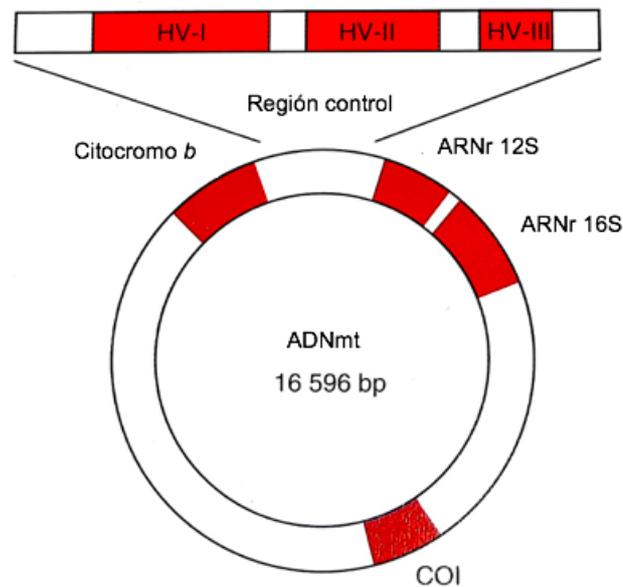


Figura 13. Figura representativa del ADNmt circular, cuya longitud es de 16596pb. Podemos ver las regiones hipervariables (HV) en la región control no codificante. Codifica para dos tipos de ARN ribosómico (ARNr), el 12S y el 16S. Otras zonas de interés forense, en cuanto a la identificación de especies, serían el gen del citocromo b y el gen de la subunidad I de la citocromo b oxidasa (COI) (Editada a partir de Goodwin et al., 2011).

Para su interpretación se compara con el perfil de referencia denominado Secuencia de Referencia Cambridge (CRS, *Cambridge Reference Sequence*), que se trata del primer genoma mitocondrial tipificado al completo. Cada perfil de ADNmt se denomina haplotipo y son agrupados en haplogrupos, según las mutaciones más relevantes que presenten. Esto ha permitido establecer un árbol filogenético (Phylotree) y determinar la agrupación geográfica a la que pertenece cada haplotipo.

Phylotree (www.phylotree.org) consiste en un árbol filogenético de ADNmt global disponible en la red. Su última actualización data del 18 de febrero de 2016. Además, existen bases de datos, como MITOMAP (www.mitomap.org/MITOMAP), que almacenan los polimorfismos y mutaciones que se encuentran en los perfiles obtenidos de ADNmt a nivel mundial. No es tan completa como Phylotree porque no diferencia haplogrupos (van Oven & Kayser, 2009).

4.5.4.b. Cromosoma Y

La totalidad del cromosoma Y se transfiere íntegro de padres a hijos varones, excepto las regiones PAR 1 y PAR 2 (*Pseudoautosomical Region*), que sufren recombinación durante la meiosis. Estos cromosomas contienen muchos polimorfismos: STR, SNP e indels. Tienen gran utilidad para identificar muestras en casos de delito sexual (Figura 14).

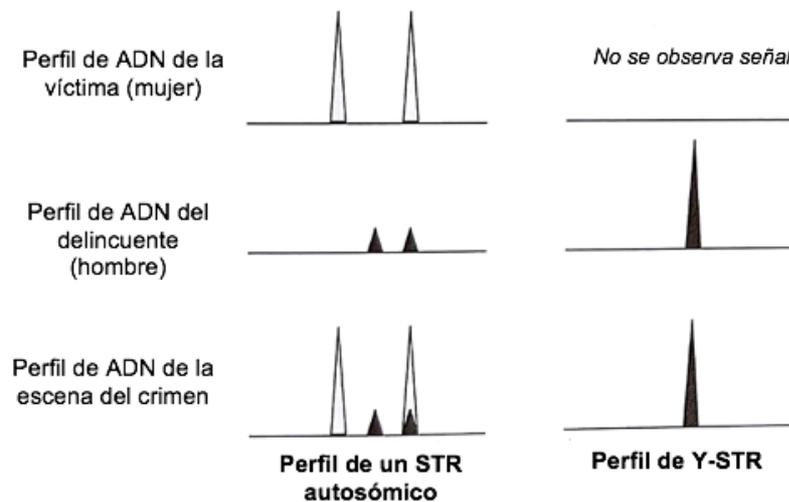


Figura 14. Esquema del proceso de identificación de perfiles en una muestra que proviene de un delito sexual y que contiene mezcla de ADN masculino y femenino (Editado a partir de Butler, 2010).

4.6. INTERPRETACIÓN DE ADN

La interpretación de ADN es una etapa laboriosa y farragosa en el establecimiento de perfiles, constituyendo un reto para los laboratorios. Para interpretar una muestra de ADN hay que tener en cuenta su potencial de transferencia, su origen biológico y la posible existencia de artefactos, siendo necesaria una mínima estandarización.

Mediante el uso de kit multiplexes se generan, por electroforesis capilar, picos de fluorescencia que nos informan a cerca de la cantidad y del tamaño de cada amplicón producido en la PCR, al que se le asocia un color concreto. Después, estos picos fluorescentes son relacionados con una escalera alélica, que corre de manera adyacente en el gel y que permite relacionar alelos desconocidos con otros ya genotipados. Para la asignación de genotipos se suelen emplear softwares de análisis de datos como Multiplex_QA (Duewer & Butler, 2006).

Para estandarizar la interpretación entre diferentes laboratorios se establecen diferentes umbrales, con el fin de identificar la aparición de diferentes tipos de artefactos, de los que se hablará más adelante. Existen numerosos parámetros, pero destacan dos: el umbral analítico (UA) y el umbral estocástico (UE) (Figura 15), ambos determinados en cada sistema de electroforesis capilar. No obstante, es recomendable que cada laboratorio los intente ajustar a sus necesidades y/o características.

El UA se trata del valor, en RFUs, por debajo del cual los picos de alelos no se pueden distinguir del ruido de fondo, pasando a considerarse irreales. Solo si se encuentran por encima de este límite serán almacenados en el software. Por otro lado, el UE, muestra el valor, en RFUs, por encima del cual es improbable que algún alelo en heterocigosis haya

desaparecido, es decir, se consideraría como un locus de genotipo homocigoto (Crespillo, Luque, Paredes, & Barrio, 2012).

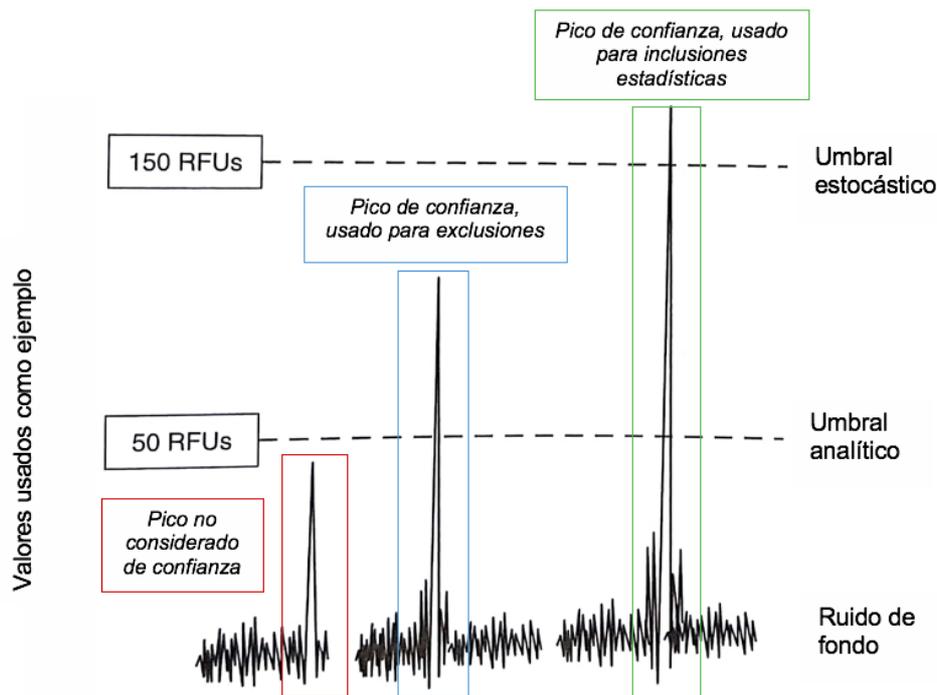


Figura 15. Esquema representativo del umbral analítico (UA) y estocástico (UE). Por debajo de UA (50 RFUs), el alelo no se considera de confianza, ya que es difícil distinguirlo del ruido de fondo. Si el pico se establece por encima de UE (150 RFUs), permitiría hacer inclusiones estadísticas. Si se encuentra entre ambos umbrales, solo permitiría realizar exclusiones (Editada a partir de Butler, 2009).

4.7. PROBLEMAS

Es frecuente que, tras todo el proceso de tipificación de ADN, se obtengan resultados que no se corresponden con el genotipo verdadero del individuo. Por lo general, existen alelos que son más propensos que otros a sufrir estos errores de genotipado. Además, se ha observado la existencia de una relación directamente proporcional entre la aparición de errores y el tamaño del amplicón de la PCR. Estos artefactos se pueden agrupar en cuatro categorías (Pompanon, Bonin, Bellemain, & Taberlet, 2005):

- Debido a interacciones con la cadena de ADN. Se producen cuando, por ejemplo, existe una mutación en la secuencia del cebador, produciendo un fenómeno conocido como alelo nulo. Este efecto se trata de la no amplificación de un alelo como consecuencia de una mutación en el cebador, normalmente en el extremo 3'.
- Por un baja cantidad o calidad del ADN. Las muestras LCN favorecen los abandonos alélicos (no amplificación estocástica de un alelo en un loci heterocigoto) o la producción de alelos falsos (alelo artefacto que se produce mediante la PCR). Además, este tipo de ADN aumenta considerablemente el riesgo de contaminación ya que las moléculas contaminantes tienen una mayor probabilidad de ser amplificadas mediante la PCR. Un ejemplo de sustancia contaminante sería el ácido húmico, presente en los suelos, y que se suele encontrar en muestras de cadáveres que han sido enterrados. Este agente inhibe la PCR uniéndose, de manera específica, al molde de ADN (Figura 16). Mediante

la adición de albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Seric Albumin*) se puede reducir el problema (Opel, Chung, & McCord, 2010).

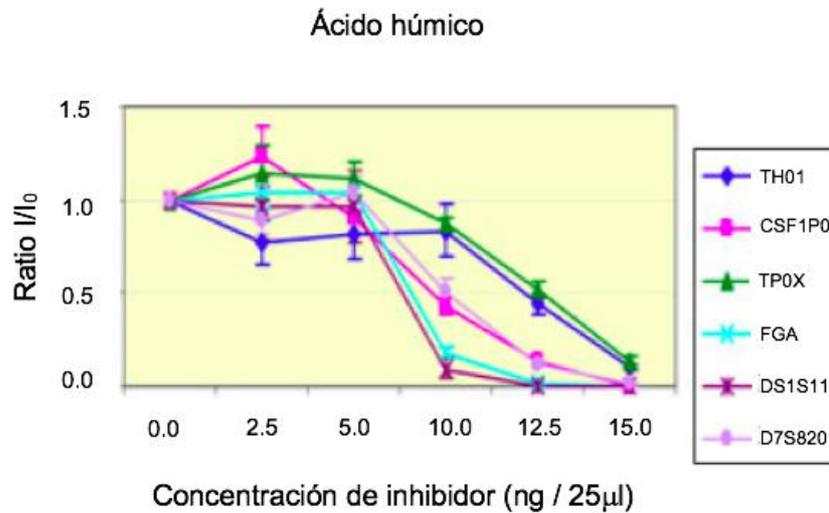


Figura 16. Resultados de la inhibición de la amplificación por PCR de algunos loci miniSTR. Se añadieron a la muestra de ADN diferentes concentraciones de ácido húmico de 0.0 a 15.0 ng / 25µl. El ratio I/I_0 corresponde a la relación entre la señal con inhibidor (I) y la señal sin inhibidor (I_0). Se observa de manera clara que existe una relación directamente proporcional entre la inhibición de la amplificación y la concentración de ácido húmico presente en la muestra. (Editada a partir de Opel et al., 2010).

- Debido a artefactos bioquímicos. Un ejemplo muy común es la adición, por parte de la *Taq* polimerasa, de un nucleótido que no está presente en el molde (normalmente adenina). Se denomina “artefacto A+” y se suele producir en el extremo 3’ de la hebra de nueva síntesis. Da lugar a picos partidos en el electroferograma (Figura 17).

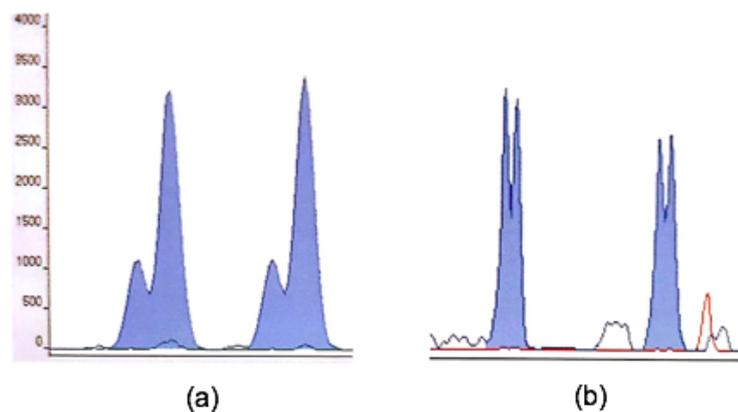


Figura 17. En la imagen (a) podemos observar como se vería un electroferograma normal. En la imagen (b) se aprecia la aparición de picos partidos (Editada a partir de Goodwin et al., 2010).

- Debido a errores humanos. Esta sería la causa principal de error en el genotipado, con un 93% de incidencia (Hoffman & Amos, 2005). Aquí influye en gran medida la experiencia del investigador, así como su manera de trabajar.

Para evitar estos problemas, se podrían tomar varias medidas. La primera sería asegurarse de que los experimentos realizados son realistas en cuanto a la cantidad de

muestra y las técnicas disponibles. Por otra parte, se podría realizar un estudio piloto para evaluar la tasa de error, que refleja la viabilidad de los genotipos obtenidos. Esto se llevaría a cabo con softwares como GEMINI (Valière & Berthier, 2002). Por último, se recomienda realizar controles de calidad a tiempo real en cada paso del análisis. No obstante, todavía no existen normas estrictas a cerca de esto, ni tampoco una estandarización (Pompanon et al., 2005).

5. CONCLUSIONES

Las Ciencias Forenses se han visto beneficiadas, tanto por el descubrimiento de la molécula de ADN como por la aparición de técnicas que permiten su tipificación al completo. Gracias a esto, las muestras analizadas en los laboratorios científicos tienen un gran peso como prueba criminal a la hora de juzgar a un individuo.

A pesar de que hace 25 años del desarrollo de la técnica de la PCR para el análisis de ADN, esta sigue siendo la principal herramienta de la que disponen la inmensa mayoría de laboratorios científicos en el mundo. Ciertamente es que, con el paso de las décadas, se ha ido perfeccionando esta práctica, pero las bases no han cambiado, siendo pionera en la actualidad la PCR a tiempo real o PCR cuantitativa.

Los diferentes estudios científicos establecen los SNP como el polimorfismo más potente a la hora de discriminar entre individuos debido a, entre otras cosas, su tasa de mutación prácticamente nula y su pequeño tamaño. El análisis de estas regiones del ADN, junto con otras como los STR, ADNmt o STR-Y, permiten una casi perfecta identificación del individuo, así como el establecimiento de sus relaciones de parentesco y su procedencia geográfica.

Tras terminar esta revisión bibliográfica se observó que, aunque han sido muchos los avances durante las últimas décadas, la Ciencia Forense todavía es susceptible de mejora, sobretodo en lo relativo a la estandarización de los protocolos y el genotipado (interpretación de los resultados). En este último, más de un 90% de los errores cometidos son de origen humano, con lo cual, tal y como indican Hoffman y Amos (2005), se deberían de centrar los esfuerzos en reducir al máximo la manipulación humana a favor de la automatización.

Las técnicas empleadas están avanzando hacia el desarrollo de máquinas portátiles, que permitan realizar el análisis de las muestras en el momento de la recolección, ahorrándose los problemas que puede traer la manipulación y transporte de las mismas.

5. CONCLUSIÓNS

As Ciencias Forenses víronse beneficiadas, tanto polo descubrimento da molécula de ADN como pola aparición de técnicas que permiten a súa tipificación ao completo. Grazas a isto, as mostrás analizadas nos laboratorios científicos teñen un gran peso como proba criminal á hora de xulgar a un individuo.

A pesar de que hai 25 anos do desenvolvemento da técnica da PCR para a análise de ADN, esta segue sendo a principal ferramenta da que dispoñen a inmensa maioría de laboratorios científicos no mundo. Certo é que, co paso das décadas, foise perfeccionando esta práctica, pero as bases non cambiaron, sendo pioneira na actualidade a PCR a tempo real ou PCR cuantitativa.

Os diferentes estudos científicos establecen os SNP como o polimorfismo máis potente á hora de discriminar entre individuos debido a, entre outras cousas, a súa taxa de mutación practicamente nula e o seu pequeno tamaño. A análise destas rexións do ADN, xunto con outras como os STR, ADNmt ou STR-Y, permiten unha case perfecta identificación do individuo, así como o establecemento das súas relacións de parentesco e a súa procedencia xeográfica.

Tras rematar esta revisión bibliográfica observouse que, aínda que foron moitos os avances durante as últimas décadas, a Ciencia Forense aínda é susceptible de mellora, sobre todo no relativo á estandarización dos protocolos e o xenotipado (interpretación dos resultados). Neste último, máis dun 90% dos erros cometidos son de orixe humana, co cal, tal e como indican Hoffman e Amos (2005), deberíanse de centrar os esforzos en reducir ao máximo a manipulación humana a favor da automatización.

As técnicas empregadas están a avanzar cara ao desenvolvemento de máquinas portátiles, que permitan realizar a análise das mostras no momento da recolección, aforrándose os problemas que pode traer a manipulación e transporte das mesmas.

5. CONCLUSIONS

Forensic Sciences have benefited, both by the discovery of the DNA molecule and by the emergence of techniques that allow its complete typing. Thanks to this, the samples analysed in scientific laboratories have a great weight as criminal evidence when judging an individual.

Although 25 years ago the development of the PCR technique for DNA analysis, this remains the main tool available to the vast majority of scientific laboratories in the world. It is true that, with the passage of decades, this practice has been perfected, but the bases have not changed, pioneering real-time PCR or quantitative PCR.

The different scientific studies establish the SNP as the most powerful polymorphism when discriminating between individuals due to, among other things, its practically null mutation rate and its small size. The analysis of these DNA regions, together with others such as STR, mtDNA or STR-Y, allow an almost perfect identification of the individual, as well as the establishment of their kinship relationships and their geographical origin.

After finishing this bibliographical review, it was observed that, although there have been many advances during the last decades, Forensic Science is still susceptible to improvement, especially in relation to the standardization of protocols and genotyping (interpretation of results). In the latter, more than 90% of the errors committed are of human origin, which, as indicated by Hoffman and Amos (2005), should focus efforts to minimize human manipulation in favour of the automation.

The techniques used are advancing towards the development of portable machines, which allow the analysis of the samples at the time of collection, saving the problems that handling and transportation of the same can bring.

6. BIBLIOGRAFÍA

Brevnov, M. G., Pawar, H. S., Mundt, J., Calandro, L. M., Furtado, M. R., & Shewale, J. G.

- (2009). Developmental validation of the PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *Journal of Forensic Sciences*, 54(3), 599–607. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01013.x
- Budimlija, Z. M., Lechpammer, M., Popiolek, D., Fogt, F., Prinz, M., & Bieber, F. R. (2005). Forensic applications of laser capture microdissection: Use in DNA-based parentage testing and platform validation. *Croatian Medical Journal*, 46(4), 549–555.
Recuperado de <http://www.cmj.hr>
- Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines?: The case for MIQE. *Methods*, 50(4), 217–226. doi:10.1016/j.ymeth.2009.12.006
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Butler, J. M. (2009). *Fundamentals of forensic DNA typing*. Burlington, MA: Academic Press.
- Crespillo, M., Luque, J. A., Paredes, M. R., & Barrio, P. A. (2012). *Criterios mínimos recomendados para la aceptación y evaluación de perfiles mezclas*. doi:10.13140/RG.2.2.14617.72800
- Duewer, D. L., & Butler, J. M. (2006). Multiplex_QA: An exploratory quality assessment tool for multiplexed electrophoretic assays. *Electrophoresis*, 27(19), 3735–3746. doi:10.1002/elps.200600116
- Gettings, K. B., Kiesler, K. M., & Vallone, P. M. (2015). Performance of a next generation sequencing SNP assay on degraded DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 1–9. doi:10.1016/j.fsigen.2015.04.010
- Gill, P., Fereday, L., Morling, N., & Schneider, P. M. (2006). New multiplexes for Europe—Amendments and clarification of strategic development. *Forensic Science International*, 163(1–2), 155–157. doi:10.1016/j.forsciint.2005.11.025
- Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An introduction to forensic genetics* (2nd ed.). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Hoffman, J. I., & Amos, W. (2005). Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14(2), 599–612. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02419.x
- Hombreiro Nogueira, L. (2013). *El ADN de Locard: Genética forense y criminalista*. Madrid: Reus.
- Instituto de Ciencias Forenses “Luis Concheiro” (2016). Tipos de marcadores genéticos. Recuperado de <http://www.usc.es/gl/institutos/incifor>
- Jiang, Z., Zhang, X., Deka, R., & Jin, L. (2005). Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Research*, 33(10), e91. doi:10.1093/nar/gni089
- Kidd, K. K., Pakstis, A. J., Speed, W. C., Grigorenko, E. L., Kajuna, S. L. B., Karoma, N. J., ... Kidd, J. R. (2006). Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Science International*, 164(1), 20–32. doi:10.1016/j.forsciint.2005.11.017
- Lee, S. B., McCord, B., & Buel, E. (2014). Advances in forensic DNA quantification: A review. *Electrophoresis*, 35(21–22), 3044–3052. doi:10.1002/elps.201400187
- McDonald, J. P., Hall, A., Gasparutto, D., Cadet, J., Ballantyne, J., & Woodgate, R. (2006). Novel thermostable Y-family polymerases: Applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs. *Nucleic Acids Research*, 34(4), 1102–1111. doi:10.1093/nar/gkj512
- Nicklas, J. A., & Buel, E. (2006). Simultaneous determination of total human and male DNA using a duplex real-time PCR assay. *Journal of Forensic Sciences*, 51(5), 1005–1015. doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00211.x
- Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms

- using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55(1), 25–33. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x
- Pakstis, A. J., Speed, W. C., Fang, R., Hyland, F. C. L., Furtado, M. R., Kidd, J. R., & Kidd, K. K. (2010). SNPs for a universal individual identification panel. *Human Genetics*, 127(3), 315–324. doi:10.1007/s00439-009-0771-1
- Pereira, R., Phillips, C., Alves, C., Amorim, A., Carracedo, Á., & Gusmao, L. (2009). A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis*, 30(21), 3682–3690. doi:10.1002/elps.200900274
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., & Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 847–859. doi:10.1038/nrg1707
- Rogalla, U., Rychlicka, E., Derenko, M. V., Malyarchuk, B. A., & Grzybowski, T. (2015). Simple and cost-effective 14-loci SNP assay designed for differentiation of European, East Asian and African samples. *Forensic Science International: Genetics*, 14, 42–49. doi:10.1016/j.fsigen.2014.09.009
- Sanders, C. T., Sanchez, N., Ballantyne, J., & Peterson, D. A. (2006). Laser microdissection separation of pure spermatozoa from epithelial cells for short tandem repeat analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 51(4), 748–757. doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00180.x
- Swango, K. L., Timken, M. D., Chong, M. D., & Buoncristiani, M. R. (2006). A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic Science International*, 158(1), 14–26. doi:10.1016/j.forsciint.2005.04.034
- Valière, N., Berthier, P., Mouchiroud, D., & Pontier, D. (2002). GEMINI: Software for testing the effects of genotyping errors and multitubes approach for individual identification. *Molecular Ecology Notes*, 2(1), 83–86. doi:10.1046/j.1471-8286.2002.00134.x
- van Oorschot, R. A. H., Ballantyne, K. N., & Mitchell, R. J. (2010). Forensic trace DNA: A review. *Investigative Genetics*, 1, 14. doi:10.1186/2041-2223-1-14
- van Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), E386-E394. doi:10.1002/humu.20921
- Vandenberg, N., & Van Oorschot, R. A. H. (2006). The use of Polilight® in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), 361–370. doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x
- Vandewoestyne, M., & Deforce, D. (2010). Laser capture microdissection in forensic research: A review. *International Journal of Legal Medicine*, 124(6), 513–521. doi:10.1007/s00414-010-0499-4
- Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1–3), 1–17. doi:10.1016/j.forsciint.2009.02.013
- Walsh, S., Wollstein, A., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., ... Kayser, M. (2012). DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 330–340. doi:10.1016/j.fsigen.2011.07.009
- Weedn, V. W., & Roby, R. K. (1993). Forensic DNA testing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 117(5), 486–491.
- Yarbrough, L. R. (1992). Forensic DNA typing. *Science*, 255(5048), 1052-1055. doi:10.1126/science.1546302