



Optimización del análisis de ADN de restos óseos críticos



Christian Haarkötter Cardoso
Tesis Doctoral

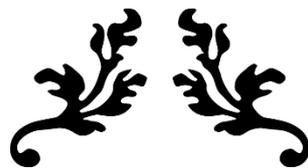
Supervisores: J.C. Álvarez Merino
J.A. Lorente Acosta

Marzo 2024



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ADN
DE RESTOS ÓSEOS
CRÍTICOS · OPTIMIZATION OF FORENSIC
DNA ANALYSIS OF CRITICAL SKELETAL
REMAINS**



TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CRIMINOLOGÍA
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: CRIMINALÍSTICA



DOCTORANDO: CHRISTIAN HAARKÖTTER CARDOSO
DIRECTOR: DR. JUAN CARLOS ÁLVAREZ MERINO
TUTOR: DR. JOSÉ ANTONIO LORENTE ACOSTA

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Christian Haarkötter Cardoso
ISBN: 978-84-1195-277-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/91057>



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**



El doctorando Christian Haarkötter Cardoso y los directores Juan Carlos Álvarez Merino y José Antonio Lorente Acosta garantizamos, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, que el trabajo realizado por el doctorando y supervisado por los directores se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Asimismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para ser admitido a trámite, a su lectura y defensa pública, con el fin de obtener el Título de Doctor, y por lo tanto AUTORIZAMOS la presentación de la referida tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero.

Director de la tesis

Tutor de la tesis

Dr. Juan Carlos Álvarez Merino

Dr. José Antonio Lorente Acosta

Doctorando

D. Christian Haarkötter Cardoso

Financiación

Esta tesis se ha realizado, durante una primera etapa con el Programa de contratos predoctorales 2019 de la Universidad de Granada, y en una segunda etapa en el marco de las Ayudas para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, código FPU 20/01967.

También se realizó una estancia de investigación de 3 meses de duración en el Australian Centre for Ancient DNA de la Universidad de Adelaide (Australia), financiada por las Ayudas complementarias de movilidad destinadas a beneficiarios del programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU), código EST 23/00110.

El diseño de la cubierta ha sido realizado por Diana C. Vinueza Espinosa (diana.vinueza@outlook.com), inspirado en las ediciones de la serie “Gótica” de la editorial Valdemar (<http://www.valdemar.com>). Las citas que aparecen en la tesis son también de la edición del Canon de Sherlock Holmes de la editorial Valdemar, traducido por J. A. Molina Foix.

Agradecimientos

Aunque llevo una vida retirada, me asombra echar la vista atrás y comprobar el gran número de personas que, en mayor o menor medida, contribuyeron positivamente en la realización de este proyecto. Los que me conocen saben que soy muy celoso de mi intimidad, pero no puedo evitar dedicarles unas palabras:

A mis directores, Juan Carlos Álvarez y José Antonio Lorente. He tenido la suerte de poder contar con dos grandes personas, tanto por sus conocimientos y su trayectoria profesional, como por sus valores y humanidad. Dos personas en las que he encontrado jefes, pero también amigos (y en ocasiones incluso padres).

A mis niñas: María Saiz, Xiomara Gálvez, María Isabel Medina, y Diana Vinueza. Si de alguna manera esta tesis es grande habrá sido gracias a ellas y su apoyo incondicional, tanto dentro del laboratorio como fuera de él. A mis niños: Daniel Díaz, Francisco Santiesteban, y David Puerto.

A mis compañeros del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física: Marga Jiménez, Lourdes Rodrigo, Pablo Olmedo, Pepe Santiago, Antonio Pla, Antonio Hernández, Beatriz Álvarez, Olga López, Inma Alemán, Miguel Lorente, Ana Belén Márquez, Lucas González, Claudio Hernández, Don Enrique. A Aurora Valenzuela, que me dio la oportunidad de formar parte de esta casa, y a Fernando Gil, con quien siempre puedo contar.

Al personal de la cafetería de la Facultad de Medicina (Miguel y los Pepes), siempre con una sonrisa. A Sandra González, previo Jira,

To my partners in ACAD: Xavi, Robbi, Shyam, Leo, Vilma, Gudhug, Dawn, Colin, and Siobhan, and my supervisors, Bastien and Jeremy. Thank you for being such a welcoming group, I am truly grateful for the opportunity you gave me to learn about ancient DNA with you in the Down Under.

A los amigos que me dio la Criminología, Francisco Javier Ruiz, con quien descubrí que una vida dedicada al estudio no tiene por qué estar reñida con la soledad, y a Patricia Saldaña, compañera de fatigas de esta etapa predoctoral. A Irene Adler.

A mis *fellows* Paula y Manolo, que siempre han estado ahí cuando más lo necesitaba, ya sea con un reconstituyente guiso, o con su inestimable apoyo moral.

A mi padre, Carlos Cardoso (Senior), a mi hermano, Carlos Cardoso (Junior), a mi tío, Michael Haarkötter, y a mi abuelo, Horst Haarkötter. A mi abuela, María Adolfinia Almeida.

A las Islas Canarias, y en particular a la isla de Gran Canaria, a las que dedico estos versos del poeta Tomás Morales:

*El mar es como un viejo camarada de infancia
a quien estoy unido con un salvaje amor;
yo respiré, de niño, su salobre fragancia
y aún llevo en mis oídos su bárbaro fragor.*

Índice

Introducción	1
1. Justificación	3
2. Objetivos	4
3. El ADN y la identificación humana	5
4. El análisis de ADN en restos óseos	8
4.1. ADN forense.....	8
4.2. ADN antiguo	9
5. Análisis de ADN de las víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra.....	10
5.1. Contexto histórico	10
5.2. Las fosas comunes	11
5.3. Marco jurídico aplicable a la memoria histórica y democrática	16
6. El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada.....	21
7. Referencias.....	23
Capítulo 1. La muestra de restos óseos	25
1. Características del hueso	27
1.1. Características anatómicas.....	27
1.2. Características histológicas.....	29
1.3. Características citológicas	30
2. El proceso de reducción esquelética.....	32
3. Estudio antropológico-forense del esqueleto.....	33
3.1. Estimación del sexo en el esqueleto	33
3.2. Estimación de la edad en el esqueleto	33
3.3. Estimación de patologías en el esqueleto.....	34
4. Formas de enterramiento	34
4.1. Enterramiento en cementerio.....	34
4.2. Enterramiento en cal viva.....	35
4.3. Inmersión en ácido	36
4.4. Incineración	37
4.5. Enterramiento en el mar y agua dulce	38
4.6. Enterramiento en fosas comunes	39
5. Obtención de ADN de restos óseos	44
6. Condiciones ambientales que influyen en la conservación del ADN en el hueso.....	48
6.1. Temperatura.....	49
6.2. pH.....	52
6.3. Humedad	53
6.4. Componentes inorgánicos del suelo	55
6.5. Materia orgánica y microbiota.....	57
6.6. Edafología: una visión holística.....	61
7. Experimento #1. Comparativa del análisis de ADN en hueso petroso, diente, fémur y tibia de restos óseos degradados	63
7.1. Material y métodos	63
7.2. Resultados y discusión	65
8. Conclusiones	72
9. Referencias.....	73
10. Anexo. Datos suplementarios.....	79
Capítulo 2. Preparación de la muestra y extracción de ADN	81
1. Introducción	84
2. El laboratorio de muestras mínimas	84
3. Pretratamiento de las muestras	86
3.1. Lavado de la superficie.....	86
3.2. Lavado con lejía	86
3.3. Lavado con ácido.....	87
3.4. Lavado con etanol.....	87
3.5. Lavado con peróxido de hidrógeno	88
3.6. Predigestión enzimática	88
3.7. Lijado	88
3.8. Extracción del interior del resto óseo	89
3.9. Irradiación con luz ultravioleta	89
3.10. Combinación de técnicas	89

4. Pulverización.....	90
4.1. Mortero.....	90
4.2. Freezer/Mill (SPEX™SamplePrep LLC, Methucen, NJ).....	91
4.3. TissueLyser (QIAGEN, Hilden, Alemania).....	91
5. Extracción de ADN.....	91
5.1. Desmineralización total.....	92
5.2. Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.....	92
5.3. Resina Chelex®.....	93
5.4. Tiocianato de guanidinio (GuSCN) y sílica.....	94
5.5. Desmineralización-sílica.....	95
5.6. <i>Fishing</i>	95
5.7. Kits comerciales de extracción de ADN.....	96
5.8. Comparación de los diferentes métodos de extracción.....	99
6. Purificación.....	101
6.1. Inhibidores de la PCR.....	101
6.2. Purificación manual.....	102
6.3. Kits comerciales de purificación.....	102
7. Experimento #2. Comparativa de 5 métodos de extracción de ADN en muestras críticas.....	104
7.1. Materiales y métodos.....	104
7.2. Resultados y discusión.....	107
8. Conclusiones.....	114
9. Referencias.....	116
10. Anexo. Datos suplementarios.....	123
Capítulo 3. Cuantificación de ADN.....	125
1. Introducción.....	127
2. Métodos de cuantificación de ADN antiguo.....	128
2.1. Métodos de cuantificación de ADN no basados en ácidos nucleicos.....	128
2.2. Métodos de cuantificación de ADN total genómico.....	129
2.3. Métodos específicos para humanos y primates superiores.....	131
2.4. Cuantificación de ADN con PCR a tiempo real.....	133
2.5. Otros métodos de cuantificación.....	142
3. Experimento #3. Comparativa de cuatro kits de qPCR en la cuantificación de ADN de muestras críticas.....	145
3.1. Material y métodos.....	145
3.2. Resultados y discusión.....	146
4. Conclusiones.....	150
5. Referencias.....	151
6. Anexo. Material suplementario.....	156
Capítulo 4. Amplificación de ADN.....	159
1. Introducción.....	161
2. STRs autosómicos.....	162
2.1. Kits comerciales de auSTRs.....	165
3. STRs de cromosomas sexuales.....	167
3.1. STRs del cromosoma Y (Y-STRs).....	168
3.2. STRs del cromosoma X (X-STRs).....	171
4. Otros marcadores.....	173
4.1. InDels.....	173
4.2. INNULs.....	174
5. Problemática de la amplificación y posibles soluciones.....	175
5.1. Inhibición.....	175
5.2. Efectos estocásticos.....	177
5.3. Contaminación.....	178
6. Experimento #4. Comparativa de kits comerciales de STRs autosómicos en restos óseos críticos.....	180
6.1. Material y métodos.....	180
6.2. Resultados y discusión.....	181
6.3. Conclusiones.....	187
7. Experimento #5. Comparativa de kits comerciales de STRs del cromosoma Y en restos óseos críticos.....	188
7.1. Material y métodos.....	188
7.2. Resultados y discusión.....	189
7.3. Conclusiones.....	193
8. Experimento #6. Evaluación del uso del kit de INNULs InnoTyper® 21 en restos óseos críticos.....	195
8.1. Material y métodos.....	195
8.2. Resultados y discusión.....	196
8.3. Conclusiones.....	199
9. Referencias.....	200
10. Anexo I. Material suplementario del Experimento #4.....	208

11. Anexo II. Material suplementario del Experimento #5	210
12. Anexo III. Material suplementario del Experimento #6	212
Capítulo 5. Secuenciación de ADN	215
1. Introducción	217
2. Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)	217
2.1. Tipos de SNPs	218
2.2. Técnicas de análisis de SNPs	222
3. Análisis de ADN mitocondrial	223
3.1. Estructura del ADN mitocondrial	223
3.2. Características del ADN mitocondrial	224
3.3. Aplicaciones del análisis de ADN mitocondrial	225
3.4. Procedimiento analítico del ADN mitocondrial	226
4. Secuenciación de nueva generación	231
4.1. Métodos de secuenciación	232
4.2. Plataformas actuales en el ámbito forense	236
5. Secuenciación de ADN antiguo	240
5.1. Preparación de la librería	241
5.2. Indexación	242
5.3. <i>Shotgun sequencing</i>	243
5.4. Enriquecimiento mediante captura por hibridación	244
5.5. Bioinformática	245
6. Experimento #7. Estudio piloto de las aplicaciones de las técnicas de aDNA en muestras forenses	247
6.1. Muestras	247
6.2. Material y métodos	247
6.3. Resultados y discusión	248
6.4. Conclusiones	251
Referencias	253
Capítulo 6. Visualización de resultados	263
1. Introducción	265
2. Métodos para la separación de ADN	265
2.1. Electroforesis en gel	265
2.2. Electroforesis capilar	265
3. Métodos de detección de ADN	266
3.1. Autorradiografía	266
3.2. Tinción de plata	266
3.3. Fluorescencia	266
4. Analizadores genéticos	267
4.1. Componentes de un analizador genético	267
4.2. Instrumentos	268
4.3. Parámetros de la carrera	268
5. Análisis de datos	269
6. Interpretación de perfiles de restos óseos críticos	270
7. Cálculos estadísticos	271
8. Bases de datos	274
9. Conclusiones	275
10. Referencias	276
Capítulo 7. Calidad de los resultados de un laboratorio de ADN forense	279
1. Introducción	281
2. Requisitos generales: imparcialidad y confidencialidad	281
3. Requisitos relativos a la estructura	282
4. Requisitos relativos a los recursos	282
4.1. Personal	282
4.2. Instalaciones y condiciones ambientales	283
4.3. Equipamiento	283
4.4. Trazabilidad metrológica	284
4.5. Productos y servicios suministrados externamente	284
5. Requisitos relativos al proceso	284
5.1. Revisión de solicitudes, ofertas y contratos	285
5.2. Selección y verificación de métodos	285
5.3. Validación de métodos	285
5.4. Muestreo	287
5.5. Manipulación de los ítems de ensayo	288
5.6. Registros técnicos	288
5.7. Aseguramiento de la validez de los resultados	289

5.8. Informe de resultados	290
5.9. Quejas.....	291
5.10. Trabajo no conforme	292
5.11. Control de los datos y gestión de la información.....	294
6. Requisitos relativos a la gestión	294
6.1. Documentación del sistema de gestión	294
6.2. Control de documentos del sistema de gestión	295
6.3. Control de registros	295
6.4. Acciones para abordar riesgos y oportunidades.....	295
6.5. Mejora	296
6.6. Acciones correctivas.....	296
6.7. Auditorías internas.....	297
6.8. Revisiones por la dirección.....	297
7. Conclusiones	297
8. Referencias.....	298
Conclusiones	301
Conclusiones	303
Conclusions.....	305

Índice de tablas

Introducción

Tabla 1. Estimaciones del número de víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra	12
Tabla 2. Recomendaciones de la Comisión Nacional del Uso Forense del ADN (CNUFADN) para la identificación genética de víctimas de la Guerra Civil Española	20

Capítulo 1. La muestra de restos óseos críticos

Tabla 1. Índice de Preservación Ósea (GPI).....	42
Tabla 2. Muestras por individuo.....	63
Tabla 3. Resultados de cuantificación (media y coeficiente de variación de cuartiles) por muestra.	65
Tabla 4. Media y coeficiente de variación cuartílico (CQV) del número de los alelos detectados con altura mayor al umbral analítico (UA), umbral estocástico (UE), unidades de fluorescencia relativa (RFU) y loci reportables por tipo de muestra.....	68

Capítulo 2. Preparación de la muestra y extracción de ADN

Tabla 1. Resumen de los métodos de extracción, sus ventajas e inconvenientes.....	91
Tabla 2. Kits comerciales para extracción de ADN en restos óseos.....	95
Tabla 3. Muestras de restos óseos analizadas.....	103
Tabla 4. Resumen de los diferentes métodos de extracción de ADN probados.....	104
Tabla 5. Resultados de cuantificación por método de extracción de ADN.....	106
Tabla 6. Resultados de los perfiles de ADN por protocolo de extracción	109
Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de los métodos analizados.....	113

Capítulo 3. Cuantificación de ADN

Tabla 1. Fluoróforos y sus desactivadores recomendados.....	138
Tabla 2. Kits comerciales para cuantificación utilizados en ADN antiguo.	139
Tabla 3. Estrategias recomendadas en función del índice de degradación (DI) y cantidad de ADN obtenidos en el ensayo de qPCR.....	140
Tabla 4. Muestras analizadas.....	145

Capítulo 4. Amplificación de ADN

Tabla 1. Kits comerciales de amplificación de auSTRs	166
Tabla 2. Kits comerciales de Y-STRs	170
Tabla 3. Kit comercial para análisis de X-STRs.....	172
Tabla 4. Principales sustancias inhibidores y sus fuentes que pueden afectar al análisis de ADN	175
Tabla 5. Número de ciclos recomendados según la cantidad de ADN de la muestra para el kit GlobalFiler™	178
Tabla 6. Muestras de restos humanos analizadas	180
Tabla 7. Promedio y coeficientes de variación cuartílicos de las variables estudiadas en los perfiles por kit	182
Tabla 8. Falsos negativos y falsos positivos por pareja de kits.....	185
Tabla 9. Muestras para la comparativa de kits de Y-STRs.....	188
Tabla 10. Resultados promedio y coeficiente de variación cuartílico (CQV) por kit comercial.....	189
Tabla 11. Grupos de muestras por cantidad de ADN	193
Tabla 12. Grupos de muestras por número de marcadores de auSTRs.....	193
Tabla 13. Muestras de restos humanos críticos para análisis con Innotyper®21 y GlobalFiler™.....	195
Tabla 14. Resultados de los perfiles genéticos obtenidos con GlobalFiler™ e Innotyper® 21.....	196

Capítulo 5. Secuenciación de ADN

Tabla 1. Diferencias entre STRs y SNPs.....	218
Tabla 2. Paneles de SNPs de identificación	219
Tabla 3. Paneles de SNPs de ancestralidad	220
Tabla 4. Paneles de SNPs fenotípicos	221
Tabla 5. Estrategias de amplificación de ADN mitocondrial	227
Tabla 6. Paneles comerciales de NGS	237
Tabla 7. Ventajas e inconvenientes del análisis de ADN mediante NGS	239
Tabla 8. Muestras de restos óseos analizadas en el Experimento #7	247
Tabla 9. Resultados de cuantificación (Quantifiler™ Trio) y amplificación de STRs autosómicos (Globalfiler™). 249	
Tabla 10. Resultados de shotgun sequencing	249

Capítulo 6. Visualización de resultados

Tabla 1. Instrumentos de electroforesis capilar	268
Tabla 2. Valores de los coeficientes de familiaridad (k) según la relación de familiaridad.....	272

Capítulo 7. Calidad de los resultados de un laboratorio de ADN forense

Tabla 1. Recomendaciones de equipamiento y material para un laboratorio forense de análisis de ADN	283
Tabla 2. Parámetros a estudiar en una validación.....	286
Tabla 3. Parámetros de validación interna en cada etapa analítica	286
Tabla 4. Recomendaciones de almacenamiento a corto y largo plazo de diferentes muestras biológicas	288
Tabla 5. Ventajas y desventajas de los diferentes modelos de ensayo de aptitud	289
Tabla 6. Recomendaciones de la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN.....	291
Tabla 7. Medidas de prevención de la contaminación.....	292
Tabla 8. Riesgos y acciones correctivas de un laboratorio de Genética forense.....	296

Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Estructura del ADN.....	7
Figura 2. Mapa de las fosas comunes de España.....	13
Figura 3. Mapa de las fosas comunes de Andalucía.....	13
Figura 4. Mapa de fosas comunes de Andalucía.....	15
Figura 5. Muestras de individuos y familiares analizadas por fosa.....	22

Capítulo 1. La muestra de restos óseos críticos

Figura 1. Tipos de hueso del cuerpo humano.....	28
Figura 2. Tipos de dientes humanos.....	28
Figura 3. Sistema de Havers.....	29
Figura 4. Esquema histológico del diente.....	30
Figura 5. Células del tejido óseo.....	31
Figura 6. Células del tejido dental.....	31
Figura 7. Porcentaje de éxito en el análisis de ADN mitocondrial en diferentes restos óseos.....	45
Figura 8. Número de muestras, número de resultados y porcentaje de éxito.....	45
Figura 9. Histología del hueso petroso.....	47
Figura 10. Orden de prioridad para toma de muestra de restos óseos.....	48
Figura 11. Zonas climáticas de Andalucía.....	51
Figura 12. Mapa del pH del suelo de Andalucía.....	53
Figura 13. Humedad equivalente del suelo de Andalucía.....	55
Figura 14. Contenido en arcilla del suelo de Andalucía.....	56
Figura 15. Contenido en arena del suelo de Andalucía.....	57
Figura 16. Contenido en materia orgánica en el suelo de Andalucía.....	58
Figura 17. Diagramas de caja de los datos de cuantificación.....	66
Figura 18. Cantidad de diana pequeña de ADN detectada por individuo.....	67
Figura 19. Diagramas de caja del número de alelos detectados (50 RFU), número de alelos que superan el umbral estocástico (365 RFU), unidades relativas de fluorescencia (RFU) y número de marcadores reportables por muestra.....	69
Figura 20. Número de marcadores reportables alcanzados por cada tipo de muestra.....	70
Figura 21. Dos perfiles genéticos del mismo individuo de dos muestras diferentes: fémur y hueso petroso.....	72

Capítulo 2. Preparación de la muestra y extracción de ADN

Figura 1. Urna de metacrilato para limpieza y fragmentación del resto óseo.....	88
Figura 2. Técnicas de eliminación de ADN exógeno de la muestra de restos óseos.....	89
Figura 3. Esquema del protocolo de extracción orgánica.....	92
Figura 4. Esquema del protocolo de Chelex®-100 en restos óseos.....	93
Figura 5. Esquema de la extracción de ADN por el método de sílice.....	93
Figura 6. Protocolo de desmineralización-sílica.....	94
Figura 7. Protocolo de <i>fishing</i>	95
Figura 8. Diagramas de caja de los datos de cuantificación, en bruto y normalizados.....	107
Figura 9. Diagramas de caja de los parámetros de los perfiles de ADN obtenidos por cada protocolo.....	110
Figura 10. RFU promedio por marcador por método de extracción.....	111

Capítulo 3. Cuantificación de ADN

Figura 1. Esquema de la espectrofotometría UV.....	129
Figura 2. Esquema de la fluorimetría.....	130
Figura 3. Esquema de la electroforesis en gel.....	131
Figura 4. Esquema de la cuantificación mediante slot blot con sonda D17Z1.....	132
Figura 5. Esquema de la cuantificación mediante secuencias Alu.....	133
Figura 6. Fluorescencia detectada vs Ciclos.....	135
Figura 7. Gráfico fluorescencia vs. ciclo en PCR a tiempo real.....	135
Figura 8. Esquema de un instrumento de qPCR.....	136
Figura 9. Diagrama de la sonda Taqman.....	137
Figura 10. Esquema de SYBR® Green.....	139
Figura 11. Diagramas de caja de los valores de cuantificación por kit.....	148
Figura 12. Gráficos de barra de los resultados de cuantificación por muestra.....	149

Capítulo 4. Amplificación de ADN

Figura 1. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.....	162
---	-----

Figura 2. Short tandem repeats (STRs)	163
Figura 3. Esquema de la herencia de los STRs	163
Figura 4. Esquema de los amplicones de los diferentes kits comerciales de auSTRs por tamaño en pares de bases	167
Figura 5. Esquema de la herencia del cromosoma Y y del ADN mitocondrial	168
Figura 6. Esquema de una secuencia de ADN palindrómica y de los marcadores DYS385 y DYS389	169
Figura 7. Esquema de los amplicones de los diferentes kits de Y-STRs por tamaño en pares de bases	171
Figura 8. Esquema de la herencia del cromosoma X	171
Figura 9. Esquema de los amplicones del kit Investigator® Argus X-12 QS	173
Figura 10. Rango de tamaño de los amplicones (pb) de los diferentes kits comerciales	173
Figura 11. Esquema de un InDel	174
Figura 12. Diagramas de caja de los parámetros de los electroferogramas por kit comercial	182
Figura 13. Gráficos los parámetros de amplificación estudiados por kit comercial y por muestra	183
Figura 14. Mapa de calor de los diferentes marcadores por kit	184
Figura 15. Diagrama de dispersión de la cantidad de ADN obtenida por qPCR en la diana pequeña y la cantidad de ADN estimada con el método de <i>RFU</i>	186
Figura 16. Diagramas de caja de los alelos que superan el umbral analítico (UA), los <i>RFU</i> , y el número de marcadores reportables. Gráfico de barras con el número de marcadores reportables por kit y por muestra	190
Figura 17. Mapa de calor de los tres kits comerciales probados por marcador	192
Figura 18. Diagramas de caja del número de alelos detectados, <i>RFU</i> y marcadores reportables de GlobalFiler™ e InnoTyper® 21	197
Figura 19. Gráfico de barras del número de marcadores reportables obtenidos por muestra y por kit	197
Figura 20. Gráfico de barras del logaritmo de la razón de verosimilitud de cada muestra por kit comercial	198

Capítulo 5. Secuenciación de ADN

Figura 1. Diagrama de los polimorfismos de tipo SNP y STR	217
Figura 2. Esquema del análisis de SNPs mediante Snapshot	222
Figura 3. Esquema del ADN mitocondrial	223
Figura 4. Haplogrupos de ADN mitocondrial	226
Figura 5. Esquema de los procedimientos analíticos de STRs autosómicos y ADN mitocondrial	226
Figura 6. Esquema de las estrategias de amplificación de ADN mitocondrial	229
Figura 7. Secuenciación por el método de Sanger	230
Figura 8. Secuenciación por pirosecuenciación	233
Figura 9. Secuenciación por ligación	233
Figura 10. Secuenciación por síntesis	234
Figura 11. Secuenciación por semiconducción	235
Figura 12. Secuenciación por nanoporos	236
Figura 13. Flujo de trabajo de un laboratorio de ADN antiguo	240
Figura 14. Patrones de daño del ADN	240
Figura 15. Electroferograma de TapeStation de una buena librería	243
Figura 16. Esquema del enriquecimiento con captura por hibridación	244
Figura 17. Esquema del pipeline nf-core/eager	246
Figura 18. Gráfica de patrón de daño molecular C>T en sentido 5'	250

Capítulo 6. Visualización de resultados

Figura 1. Moléculas de agarosa y acrilamida	265
Figura 2. Esquema de la electroforesis capilar	267
Figura 3. Umbral analítico (UA), Umbral estocástico (UE) y Peak Height Ratio (PHR)	270

Abreviaturas

Abreviatura	Definición
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aDNA	ADN antiguo
ANOVA	Análisis de la varianza
aSNPs	SNPs de ancestralidad
auSTRs	STRs autosómicos
C	Citosina
CODIS	Combined DNA Index System
CQV	Coficiente de variación cuartílico
ddNTPs	Didesoxinucleótido
dNTPs	Deoxinucleótido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
FBI	Federal Bureau Investigation
G	Guanina
GHEP-ISFG	Grupo de Habla Española y Portuguesa (véase ISFG)
HEPA	High Efficiency Particulate Air
INDELs	Inserción-delección
INNULs	Inserción-nulo
IPC	Internal PCR Control
ISFG	International Society for Forensic Genetics
iSNPs	SNPs de identificación
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilodalton
LCN-DNA	ADN de bajo número de copias
LR	Razón de verosimilitud
MPS	Secuenciación masiva en paralelo
mtDNA	ADN mitocondrial
NGS	Secuenciación de nueva generación
NIST	National Institute of Standards and Technology
NTC	Non template control
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHR	Ratio de altura de picos
phSNPs	SNPs fenotípicos
qPCR	PCR cuantitativa
REs	Elementos genéticos transponibles
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
RMP	Random match probability
RM-Y-STRs	Y-STRs de mutación rápida
rtPCR	PCR en tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
STRs	Short Tandem Repeats
SWGDM	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods
T	Timina
U	Uracilo
UA	Umbral analítico
UDG	Uracil-DNA-glicosilasa

UE	Umbral estocástico
USA	Estados Unidos de América
UV	Ultravioleta
X-SNPs	SNPs del cromosoma X
X-STRs	STRs del cromosoma X
Y-SNPs	SNPs del cromosoma Y
Y-STRs	STRs del cromosoma Y

Resumen

El descubrimiento en 1986 de las aplicaciones forenses del análisis de ADN con fines de identificación supuso una revolución en el campo de las Ciencias forenses, consolidándose como una de las disciplinas más aceptadas por los tribunales de todo el mundo. Sin embargo, y pese a la multitud de avances que han enriquecido la disciplina como la PCR en un primer momento o la secuenciación masiva más recientemente, la Genética forense no ha estado exenta de problemas, como son los perfiles mezcla, las muestras mínimas, o la degradación del ADN.

En contextos como el crimen organizado, el terrorismo, las grandes catástrofes, o las fosas comunes, el análisis de ADN en restos humanos suele constituir la única vía posible para la identificación, habida cuenta que huesos y dientes son las únicas muestras biológicas que permanecen con el paso del tiempo. Este tipo de muestras son especialmente desafiantes para los laboratorios de Genética forense, puesto que, además de tener poca cantidad de ADN, este suele encontrarse degradado. A este hecho se une la dificultad, en algunos contextos en los que el suceso y las actuaciones de identificación están muy separadas en el tiempo, de la relación familiar distante entre las muestras de restos humanos y los familiares de referencia con los que se harán las eventuales comparativas. La optimización y puesta a punto de los protocolos de análisis de restos humanos degradados para un máximo rendimiento en la obtención de un perfil genético resulta, por tanto, de especial interés para la disciplina.

El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada, primero con el programa Fénix y más recientemente con el convenio con la Junta de Andalucía de identificación de las víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra española, cuenta con una amplia experiencia en el análisis de restos humanos críticos. Es por ello por lo que se constituyó como el crisol para la realización de esta tesis doctoral, aportando tanto su experiencia previa y presente como la disponibilidad de muestras para los diferentes análisis realizados.

El objetivo de la presente tesis doctoral es la optimización del análisis de ADN, en el contexto forense, de restos humanos críticos (huesos y dientes). Para ello se ha realizado una revisión de las diferentes etapas del análisis de ADN: la muestra de restos óseos/dientes, extracción, cuantificación, amplificación, secuenciación, visualización de resultados e informe, revisando también las pautas para asegurar la calidad del proceso en el marco de la norma ISO 17025.

Para cada etapa analítica se ha tratado de hacer una comparación de las diferentes técnicas analíticas disponibles, buscando la que mejor rendimiento mostraba para cada una de ellas:

En el Capítulo 1, sobre la muestra de restos óseos o dientes, se comparó el rendimiento del análisis de ADN en diferentes restos humanos del mismo individuo: fémur, tibia, dientes, y hueso petroso. Se observó que tanto los dientes como el hueso petroso, especialmente este último, son, en general, los mejores sustratos para obtener un perfil genético.

En el Capítulo 2, sobre la extracción de ADN se compararon cinco protocolos de extracción distintos: extracción orgánica, sílice en suspensión, sílice en columna, y con los kits comerciales PrepFiler™ BTA e InnoXtract™. Se vio que el protocolo de extracción orgánica con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico era el que mejor rendimiento tenía en términos de cuantificación y de perfil genético obtenido.

En el Capítulo 3, sobre la cuantificación de ADN, se comparó la eficiencia de cuatro kits comerciales de qPCR: Quantifiler™ Trio, PowerQuant™, Quantiplex® Pro, e InnoQuant™ HY. Este último kit destacó en términos de sensibilidad a la hora de detectar ADN, así como en la correlación entre la cantidad de ADN observada en la qPCR y el perfil genético que se obtiene posteriormente.

En el Capítulo 4, sobre la amplificación de ADN, se compararon kits de STRs autosómicos (Globalfiler™, PowerPlex® Fusion 6C, e Investigator® 24Plex QS), STRs del cromosoma Y (Yfiler™ Plus, PowerPlex® Y23, e Investigator® Argus Y-28), explorándose también la aplicación de un kit de INNULs (InnoTyper® 21) comparando su poder de discriminación con el de un kit de STRs autosómicos (Globalfiler™). Si bien no se observaron diferencias significativas entre los kits de STRs autosómicos, sí se vieron diferencias en términos de mayor número de marcadores obtenidos del kit PowerPlex® Y23 con respecto a los otros. El kit de INNULs obtuvo un mayor número de marcadores que el kit de STRs autosómicos, teniendo, no obstante, un menor poder de discriminación.

En el Capítulo 5 se revisan las técnicas de visualización de los resultados, así como el análisis de los perfiles genéticos de restos humanos críticos, y los cálculos estadísticos en los resultados de identificación.

En el Capítulo 6, sobre la secuenciación de ADN, se exploró la aplicación de las técnicas de análisis de ADN antiguo en muestras forenses, realizándose en muestras analizadas con STRs autosómicos las técnicas de preparación de librería, *shotgun sequencing*, enriquecimiento con captura de ADN con el kit comercial Twist Bioscience, y *deep shotgun*.

Finalmente, en el Capítulo 7, se revisan los diferentes puntos contenidos en la norma ISO 17025, sobre los requisitos de competencia de los laboratorios de ensayo, haciendo especial incidencia en los aspectos a tener en cuenta en un laboratorio de Genética forense.

Abstract

The discovery in 1986 of the forensic applications of DNA analysis for identification purposes marked a revolution in the field of forensic sciences, establishing itself as one of the most accepted disciplines by courts worldwide. However, despite numerous advances that have enriched the discipline, such as PCR initially and more recently massively parallel sequencing, forensic genetics has not been without its challenges. These include DNA mixture analysis, low copy number DNA, or DNA degradation.

In contexts such as organized crime, terrorism, disaster victim identification, or mass graves, DNA analysis on human remains often constitutes the only possible method for identification, given that bones and teeth are the only biological remain that endure over time. These types of samples pose challenges for forensic genetics laboratories due to their low DNA quantity and DNA degradation. Additionally, the distant familial relationship between human remains and reference family members for eventual comparisons can complicate identification efforts, especially in situations in which the incident and identification actions are widely separated in time. Therefore, optimizing and fine-tuning protocols for the analysis of degraded human remains to achieve maximum efficiency in obtaining a genetic profile is of special interest to the discipline.

The Laboratory of Genetic Identification at the University of Granada, initially with the Phoenix program and more recently through an agreement with the Andalusian government for the identification of victims from the Spanish Civil War and post-war period, possesses extensive experience in analysing critical human remains. This laboratory served as the crucible for conducting this doctoral thesis, contributing both its prior and current experience, as well as the availability of samples for the various analyses conducted.

The objective of this doctoral thesis is the optimization of DNA analysis, in the forensic context, for critical human remains (bones and teeth). To achieve this, a review of the different stages of DNA analysis was conducted: sampling of bone/teeth remains, extraction, quantification, amplification, sequencing, results visualization, and reporting. The review also considered guidelines to ensure process quality within the framework of ISO 17025 standards.

For each analytical stage, a comparison of different available analytical techniques was attempted, seeking the one that showed the best performance for each stage:

In Chapter 1, concerning bone or teeth samples, the performance of DNA analysis was compared in different human remains from the same individual: femur, tibia, teeth, and petrous bone. It was observed that both teeth and the petrous bone, especially the latter, are generally the best substrates for obtaining a genetic profile.

In Chapter 2, regarding DNA extraction, five different extraction protocols were compared: organic extraction, silica in suspension, silica on a column, and with commercial kits PrepFiler™ BTA and InnoXtract™. It was found that the organic extraction protocol with phenol/chloroform/isoamyl alcohol had the best performance in terms of quantification and obtained genetic profile.

In Chapter 3, about DNA quantification, the efficiency of four commercial qPCR kits was compared: Quantifiler™ Trio, PowerQuant™, Quantiplex® Pro, and InnoQuant™ HY. The latter kit stood out in terms of sensitivity in detecting DNA, as well as the correlation between the amount of DNA observed in qPCR and the genetic profile obtained subsequently.

In Chapter 4, concerning DNA amplification, autosomal STRs commercial kits (Globalfiler™, PowerPlex® Fusion 6C, and Investigator® 24Plex QS), Y-STRs commercial kits (Yfiler™ Plus, PowerPlex® Y23, and Investigator® Argus Y-28), and the application of an INNULs kit (InnoTyper® 21) were compared, also comparing its discrimination power with an autosomal STR

kit (Globalfiler™). While no significant differences were observed between autosomal STR kits, differences were seen in terms of a higher number of markers obtained from the PowerPlex® Y23 kit compared to the others. The INNULs kit obtained a higher number of markers than the autosomal STR kit, albeit with lower discrimination power.

Chapter 5 reviews the different visualization techniques, genetic profile analysis of critical human remains, and statistical calculations in identification results.

In Chapter 6, on DNA sequencing, the application of ancient DNA analysis techniques on forensic samples was explored. Techniques such as library preparation, shotgun sequencing, DNA capture enrichment with the commercial kit Twist Bioscience, and deep shotgun were performed on samples analyzed with autosomal STRs.

Finally, in Chapter 7, the different recommendations contained in ISO 17025 standards regarding the competence requirements of testing laboratories are reviewed, with a particular emphasis on aspects to consider in a forensic genetics laboratory.

Introducción



Es un error mayúsculo el teorizar sin tener todavía todas las pruebas. Eso puede afectar al juicio que uno se forme.

Sherlock Holmes, Estudio en escarlata.



1. Justificación

El análisis de ADN es en la actualidad una de las piedras angulares de las Ciencias Forenses en general y de la Criminalística en particular desde la introducción generalizada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a inicios de la década de los 80. Sin embargo, hay ciertos retos que persisten, como es el análisis e identificación de restos óseos. Los centros de investigación y análisis que se enfrentan día a día a esta casuística, como es el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada, centro en el que se desarrollará este trabajo, necesitan avanzar y conseguir superar las limitaciones existentes. Además, en nuestro caso operamos en el marco de la Memoria Democrática en Andalucía regulada por la Ley 2/2017, de 28 de marzo, de Memoria Histórica y Democrática de Andalucía, donde tenemos el encargo de tratar de identificar a todas las víctimas de nuestra región, que se elevan a más de 45 500. Contextos históricos aparte, el estudio genético de los restos óseos cobra especial importancia en personas desaparecidas [1], casos que en mayor o menor proporción se presentan en todos los países relativa frecuencia y de los que se demanda una solución pronta y eficaz.

El análisis de ADN de restos óseos críticos es uno de los problemas actuales de la Genética forense, entre otros motivos porque no se dispone de una metodología global, un protocolo holístico que contemple todo el contexto que influye en el análisis y en la obtención de resultados: el lugar de enterramiento (terreno), el tiempo o data, el tipo de piezas óseas disponibles, posibles inhibidores, metodologías disponibles de extracción y purificación, y ya en la última fase, técnicas y equipos de análisis disponibles. Se plantean, pues, problemas relacionados con la degradación del ADN, inhibidores de la PCR, o la contaminación de las muestras con ADN exógeno.

A estas dificultades analíticas de degradación y contaminación se unen las dificultades comparativas: una identificación se hace por comparación entre el material genético obtenido y el de supuestos familiares del individuo al que pertenecen los restos, parentesco que en ocasiones suele ser lejano. Esto significa que no es suficiente con conseguir un perfil excelente, sino que la relación de familiaridad debe ser lo suficientemente cercana como para plantear comparaciones, o complementarse con marcadores alternativos como son los de linaje: cromosoma Y o ADN mitocondrial.

Desde hace más de 20 años, en el análisis forense son los *Short Tandem Repeats* o STRs (secuencias cortas en tándem, cuyo número de repeticiones varía entre individuos) los que más atención reciben, cabe destacar el uso cada vez más frecuente y sistematizado de las variaciones de un solo nucleótido entre individuos (*Single Nucleotide Polimorphism* o SNPs), cuyos fragmentos a analizar, al ser más pequeños se adecuan mejor con las muestras degradadas, además de que pueden prestarse a la automatización, no tienen artefactos asociados en la visualización de

resultados, e incluso su estudio permite obtener información sobre características fenotípicas y de ancestralidad del individuo [2].

En los últimos años se han ido implementando cada vez más en los laboratorios forenses las tecnologías de secuenciación masiva, también denominada secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), que empezaron con diversas aplicaciones en Medicina genómica, pero cuyo potencial captó rápidamente el interés de los científicos forenses [3]. Estos equipos permiten secuenciar en un mismo ensayo varios marcadores de STRs autosómicos, disponiendo también de paneles para ADN mitocondrial, STRs del cromosoma Y, así como SNPs de identificación, fenotípicos y de ancestralidad [4], por lo que la aplicación de esta tecnología en restos óseos degradados es especialmente interesante.

El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada trabaja desde su creación en el estudio de las últimas tecnologías de análisis de ADN, complementando así una labor investigadora con su labor docente, y cuenta con el equipamiento adecuado para el cumplimiento de los requisitos para trabajar con ADN antiguo [5]. En 1998 desarrolló en conjunto con la Guardia Civil el Programa Fénix [6], cuyo objetivo era la identificación de restos óseos sin identificar cotejándolos con una base de datos de STR y ADN mitocondrial de familiares por vía materna. En 2004 creó el Programa DNA-Prokids [7], financiado por la Universidad de Granada y diversas fundaciones, y actualmente en funcionamiento, cuyo objetivo es la lucha contra el tráfico de menores mediante la creación de bases de datos de ADN de familiares de menores desaparecidos y menores hallados en situación irregular.

El objetivo final de esta tesis es la obtención de una metodología optimizada estableciendo para cada etapa del análisis de ADN (extracción, cuantificación, amplificación y visualización de resultados) la mejor técnica para el análisis de restos óseos críticos.

2. Objetivos

Para la generación de este modelo optimizado de análisis de ADN de restos óseos críticos se han previsto los siguientes paquetes de trabajo (WP):

WP1: Estudio de la idoneidad de las diferentes muestras posibles a tomar de un esqueleto humano.

- a) Revisión de las condiciones ambientales en las que se encuentran los restos.
- b) Determinación de las piezas óseas halladas más frecuentemente y su grado de conservación.
- c) Estudio comparativo mediante datos de cuantificación y amplificación de STRs autosómicos de diferentes restos óseos de un mismo individuo (huesos largos, dientes y petroso).

WP2: Comparativa de protocolos de extracción de ADN en restos óseos críticos.

- a) Revisión de los principales procedimientos de pretratamiento y extracción de ADN en los campos forense y de ADN antiguo.
- b) Comparativa de métodos de pulverización (manual y automatizado) de restos óseos mediante datos de cuantificación y amplificación.
- c) Comparativa de métodos de extracción (extracción orgánica mediante fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, sílice en suspensión, sílice en columna, InnoXtract™ y PrepFiler™ BTA).

WP3: Contraste de kits comerciales de cuantificación mediante PCR cuantitativa (qPCR).

- a) Revisión de los principales métodos de cuantificación utilizados en análisis de ADN de restos óseos.
- b) Comparativa de los kits comerciales de cuantificación mediante qPCR: Quantifiler™ Trio, PowerQuant®, Quantiplex® Pro, e InnoQuant™ HY Fast.

WP4: Estudio de kits comerciales de STRs autosómicos, STRs de cromosoma Y, y marcadores alternativos.

- a) Revisión de los principales kits de amplificación de marcadores de STRs autosómicos, STRs sexuales y otros marcadores.
- b) Comparativa de los kits comerciales de amplificación de STRs autosómicos Globalfiler™, PowerPlex® Fusion 6C, e Investigator® 24Plex QS.
- c) Comparativa de los kits comerciales de amplificación de STRs de cromosoma Y: Yfiler™ Plus, PowerPlex® Y23, Investigator® Argus Y-28 QS.
- d) Estudio de la utilidad del kit de INNULs InnoTyper® 21 en el análisis de muestras críticas de restos óseos.

WP5: Exploración de las nuevas posibilidades ofrecidas por la secuenciación de nueva generación (NGS) y los estudios de ADN antiguo.

- a) Revisión de las técnicas de secuenciación masiva existentes y su aplicación en el ámbito forense.
- b) Análisis de muestras forenses de restos humanos críticos mediante secuenciación de nueva generación previa captura por hibridación con el kit comercial de Twist Bioscience.

3. El ADN y la identificación humana

El ácido desoxirribonucleico o ADN es una molécula que no necesita presentación, probablemente sea la biomolécula más conocida por la sociedad, y por tanto, la más incomprendida, pues si bien los medios de comunicación hablan (y exageran) constantemente sus posibilidades, muy pocas veces se habla de sus limitaciones. Pero, empecemos por el principio.

Algunos autores dividen la Historia de la Criminalística en dos etapas: una precientífica y otra científica, naciendo la segunda con el positivismo del siglo XIX, que hizo abandonar la idea de la investigación criminal basada en la experiencia por la realización de la misma con una metodología científica [8]. Tenemos que esperar hasta el siglo XIII d.C. para ver la que constituiría el primer paso de la Biología Forense, que se tenga constancia.

En China, durante la dinastía Song, apareció un juez llamado Sung Tz'u, que se diferenció del resto de sus colegas porque aplicaba la experiencia, en lugar de la intuición, para la resolución de los casos que se le presentaban. Una vez se le presentó un homicidio en una aldea, y por las heridas que presentaba el cuerpo se podía deducir que el arma utilizada era una hoz, siendo dos los campesinos sospechosos del crimen, pero sin pruebas que inculparan a uno u otro. La solución de Sung Tz'u fue pedir a los sospechosos que trajeran sus hoces y las dejaran al sol, a lo que las moscas acudieron a posarse sobre una en concreto, la que tendría restos de sangre, y por tanto, el arma homicida [9]. Este experimento, en apariencia tan trivial, marcó el inicio de la estrecha colaboración que la Biología iba a tener con la investigación criminal.

Tuvieron que pasar muchos siglos hasta llegar a Friedrich Miescher. En 1868 estaba realizando distintos experimentos con leucocitos y obtuvo un precipitado extraño y que por sus propiedades no era ni un lípido ni una proteína. Como lo extrajo del núcleo de los leucocitos, lo denominó nucleína, y aventuró que esta molécula estaba relacionada con las funciones del núcleo celular, o que incluso con ella se transmitían los caracteres hereditarios [10]. De este nombre derivaría la denominación de ácido desoxirribonucleico, o ADN.

Casi un siglo después, en 1953, se produciría el doble descubrimiento de la estructura del ADN. Por un lado Rosalind Franklin, con sus trabajos sobre difracción de rayos X, mostró la diferente estructura cristalográfica que tenía el ADN con diferentes condiciones de humedad y demostró que estaba conformado por una doble hélice [11]. Esto permitió a James Watson y Francis Crick publicar en el mismo año la que sería la imagen más conocida de la Biología en la sociedad: la estructura del ADN. El mismo consta de una doble hélice helicoidal, con las bases nitrogenadas enfrentadas entre sí (**Figura 1**). Hasta 1963 se pensaba que el ADN se encontraba únicamente en el núcleo celular, pero *Sylvan y Margit Nass* descubrieron ese año que al tratar las mitocondrias con tetraóxido de osmio y observarlas al microscopio electrónico, estas tenían una sustancia cuyas características eran las mismas que las del ADN [12], de modo que hay ADN, también, en las mitocondrias, cuya forma es la de una doble cadena circular [13].

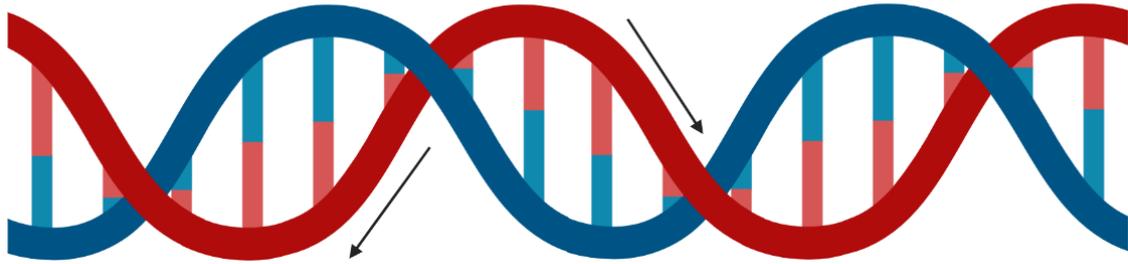


Figura 1. Estructura del ADN.

El siguiente salto, probablemente uno de los más grandes de todos, vendrá de la mano de *Kary Mullis*. En 1983, volvía con su pareja de un viaje desde San Francisco en coche y se le ocurrió que podía utilizar dos oligonucleótidos para que la ADNpolimerasa de la bacteria *Thermophilus aquaticus* sintetizara miles de copias de una región de interés del ADN, la flanqueada por los primers [14]. Fue así como se inventó la técnica de la PCR, *Polimerase Chain Reaction*, que constituirá, hasta hoy, la piedra angular de los laboratorios de Biología Molecular.

Se preguntará el lector impaciente por las relaciones entre esos descubrimientos y las Ciencias Forenses. Pues bien: la Criminalística ha tenido siempre el mismo problema junto a qué ocurrió, y es quién participó, quién estuvo allí, y sobre todo, quién lo hizo. Gracias al desarrollo de la Dactiloscopia a finales del siglo XIX se disponía de un método infalible para identificar a las personas, pero había ocasiones en las que el criminal no dejaba huellas de sus dedos, pero sí indicios biológicos como sangre o semen. En 1948 *Ouchterlony* [15] desarrolló la prueba de inmunodifusión doble, en la que se podía ver el grupo sanguíneo de una mancha de sangre, permitiendo excluir a los sospechosos si mostraban grupos sanguíneos diferentes al dubitado. Lo cual no es poco.

En 1986 una chica de quince años de Leicestershire fue violada y asesinada, repitiéndose un asesinato de las mismas características ocurrido tres años antes en dicha localidad. El criminal no había dejado huellas, pero sí semen en sus víctimas. Y un joven había confesado que las dos muertes eran cosa suya. Ante este entuerto, a alguien se le ocurrió pedir consejo a *Alec Jeffreys* [16]. En 1984 él y su equipo habían descubierto que los individuos tienen en su genoma repeticiones en tándem en número variable (a las que denominó VNTRs, *Variable Number Tandem Repeats*). Observando estas repeticiones en una madre y su hijo y otro individuo vio que los dos primeros compartían la mitad de las repeticiones, y que a su vez entre sí se diferenciaban en segundos. El potencial forense de esta técnica era enorme, porque además podía extraerse ADN de manchas antiguas, incluso de momias [17]. Así, comparó el ADN de la mancha de esperma de las víctimas con la sangre del sospechoso, que fue inmediatamente puesto en libertad, dado que el ADN no coincidía. Fue así como nació la prueba de ADN o *DNA fingerprinting*, de la que seguimos dependiendo hoy en día.

4. El análisis de ADN en restos óseos

4.1. ADN forense

Los contextos forenses en los que un hueso es el único indicio disponible son diversos: atentados terroristas, crimen organizado, desapariciones, filiaciones, desastres masivos, etc. El mismo Alec Jeffreys señaló el potencial forense del análisis de restos óseos cuando en 1992 analizó e identificó los restos de Josef Mengele hallados en Brasil [18]. Dicho análisis les resultó particularmente difícil por varios motivos: la presencia de inhibidores de naturaleza incierta en el extracto de ADN, la contaminación de ADN exógeno, y la enorme degradación presente en el poco ADN que se pudo recuperar, haciendo que el análisis de ADN en restos óseos sea impredecible, y en muchos casos poco informativo. Además, está el problema de la frecuencia alélica que las repeticiones que puedan observarse tengan, al tiempo que este tipo de indicio es muy susceptible a la contaminación del investigador.

Hay otro problema que no menciona pero que está implícito en el caso Mengele, y es el problema de con qué muestra se compara la muestra ósea. En el caso citado comparaba el perfil genético del fémur con los del hijo de Mengele, al mismo tiempo que disponía del perfil genético de la madre de este último para hacer las pertinentes comparaciones. El problema está cuando sólo se dispone para comparar el perfil de parientes más lejanos como nietos, sobrinos, primos, tataranietos, etc., en los que la posibilidad de comparación va a limitarse todavía más.

¿Por qué son tan interesantes los huesos? Ya se ha dicho que aparecen en numerosos escenarios, y si lo hacen es por sus características: pueden durar muchos años, dependiendo de las condiciones en las que estén, véase el ejemplo de las momias, o incluso algunos fósiles. El *tejido óseo* [19] constituye una especialización del tejido esquelético cuya extraordinaria dureza y resistencia viene dada por la matriz en la que se hallan embebidas sus células. Macroscópicamente, el hueso se organiza de dos maneras diferentes: en tejido óseo esponjoso, en cuyos espacios se encuentra la médula ósea, y el tejido óseo compacto, cuya disposición es diferente según el hueso; por ejemplo, en los huesos largos como el fémur, las epífisis se componen mayormente de hueso esponjoso, mientras que la diáfisis consta de un tubo de hueso compacto que envuelve la médula. Es el hueso compacto el que más nos interesa, porque histológicamente está formado por sistemas de Havers, cilindros formados por láminas concéntricas de unos 150 μm de diámetro en las que se encuentran los osteocitos, en cuyos núcleos se encuentra nuestro preciado ADN. La clave está en la matriz ósea: conforme el individuo se desarrolla hacia la adultez se va desplazando el colágeno como componente fundamental por cristales de hidroxapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que dan al hueso sus características físicas.

¿Por qué no el hueso esponjoso si en él se encuentra la médula ósea, rica en células y por ende en ADN? Porque este hecho tampoco pasa inadvertido a los microorganismos

descomponedores, que se darán un buen banquete de materia orgánica. Por tanto, el hueso compacto ofrece compartimentos virtualmente estancos en los que se hayan las células óseas. Por otro lado, tenemos los dientes, formados por una cavidad pulpar que contiene vasos sanguíneos, ramificaciones nerviosas y tejido conectivo laxo, envuelta en dentina [19], compuesta en parte por hidroxiapatita. En definitiva, una cavidad repleta de células protegida por una sustancia similar al marfil, prometedora para el análisis de ADN.

Pero sucede una cosa. En primer lugar, el *ADN se degrada constantemente*, pero nuestras células disponen de mecanismos para controlar esa degradación. Con la muerte del individuo, esos mecanismos dejan de actuar, y empieza una degradación natural a un ritmo de $5,50 \cdot 10^{-6}$ nucleótidos/año. No es mucho aparentemente, pero debemos tener en cuenta otros procesos que intervienen en la degradación del ADN [20]: rotura de enlaces, lesiones oxidativas, cruce de ADN, lesiones hidrolíticas, o reacciones de Maillard, son los procesos que intervienen e impiden la conservación del material genético. Estos procesos están mediados por varios factores, siendo temperatura, humedad y pH del medio en el que se hallan los restos los que parecen tener mayor influencia, interviniendo también los componentes del suelo, a veces conservando, a veces degradando, la mayoría de las veces aportando inhibidores de la PCR.

4.2. ADN antiguo

A principios de los años 1980s se planteó la posibilidad de recuperar las secuencias de ADN de seres vivos extintos a partir de sustratos como restos biológicos, sedimentos o suelos, aplicándose desde sus inicios las más avanzadas técnicas de secuenciación disponibles en el momento, consolidándose así los estudios de ADN antiguo (aDNA) [21].

Las características químicas del ADN ponen una barrera de entorno a un millón de años para la antigüedad de las muestras a poder analizar, considerando unas condiciones óptimas de preservación, lo que permitiría realizar estudios filogenéticos de especies extintas, estudios filogeográficos, estudios sobre la evolución de los homínidos, estudios sobre la dieta y el comportamiento, estudios de ADN de animales, plantas y bacterias contenidos en sedimentos, arqueología molecular de microorganismos relacionados con medicamentos, o el origen de animales domesticados [20].

Sobre el concepto de aDNA podemos encontrar definiciones amplias que abarcan el estudio del ADN de muestras degradadas como las forenses, especímenes de museos, hallazgos arqueológicos, o registros fósiles [22], y otros consideran que los estudios de aDNA se centran en el análisis poblacional o antropológico (dejando fuera el propósito de identificación) de muestras antiguas [23].

5. Análisis de ADN de las víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra.

5.1. Contexto histórico

Entre el 12 de julio de 1936 y el 1 de abril de 1939 tuvo lugar en España la que es conocida en su Historia como la Guerra Civil, un conflicto bélico desencadenado por un golpe de Estado militar contra la Segunda República, un régimen democrático que sustituía la monarquía de Alfonso XIII desde 1931. Una guerra entre lo que se suele denominar bando republicano y el bando sublevado, que se llamó a sí mismo bando nacional.

Son muchas las explicaciones dadas a la Guerra Civil española. Las primeras, de cierta objetividad al ser anglosajonas, apuntaban a la incapacidad de la Segunda República para afrontar la crisis de los años 30 (La Gran Depresión), un intento fallido de reforma ante la oligarquía agraria, la hostilidad carlista al sistema democrático, el enfrentamiento de la II República con la Iglesia, las relaciones comerciales y financieras del bando franquista, o las relaciones con la por aquel entonces Alemania Nazi son algunas de ellas; sin embargo, es un error común tratar la Guerra Civil como una consecuencia de la II República, debiendo verse este periodo como un continuo en el que hay una respuesta a un régimen y se instaura otro diferente [24].

En cualquier caso, tuvo lugar una Guerra Civil que culminó con el hundimiento del Estado, sucedido por la dictadura del general Francisco Franco desde 1939 a 1975, configurada como una negación del liberalismo del siglo XIX por una vuelta al Siglo de Oro. El fin de la guerra fue continuado por la represión del bando republicano: republicanos, socialistas, anarquistas y comunistas fueron fusilados, exiliados, enviados a campos de concentración, con el objetivo de reprimir cualquier desviación de la nación, uniéndose las sanciones ejemplares que caracterizarían la primera década de este régimen [25], al amparo del “DECRETO de 26 de abril de 1940 concediendo amplias facultades al Fiscal del Tribunal Supremo para proceder a instruir «Causa general» en la que se reúnan las pruebas de los hechos delictivos cometidos en todo el territorio nacional durante la dominación roja.”, investigación instruida por el Fiscal del Tribunal Supremo que elevaría al Gobierno una vez finalizada. Sobre la cantidad total de víctimas de la represión franquista hay discrepancia y se manejan dos fuentes principales, una jurídica y otra académica.

La fuente jurídica la constituye el Auto del Juzgado Central de Instrucción Nº5 (España), de 16 de octubre de 2008, por el que se acepta la competencia para la tramitación de la causa por los presuntos delitos permanentes de detención ilegal, sin dar razón del paradero, en el contexto de crímenes contra la Humanidad y se autorizan las exhumaciones, emitido por el juez Baltasar Garzón, y que entre el 17 de Julio de 1936 a diciembre de 1951 contabiliza 114.266 víctimas a partir de los datos aportados por asociaciones de familiares de las víctimas, gobiernos

autonómicos y ayuntamientos. Estas estimaciones académicas y oficiales se encuentran comparadas en la **Tabla 1**.

Las discrepancias que podemos encontrar entre los datos pueden atribuirse a la cifra negra, un concepto criminológico referido a la cantidad de conductas desviadas que quedan fuera de las estadísticas dada la tendencia lógica a la ocultación de las mismas, cifra que puede aproximarse por medio de otros métodos como las encuestas de victimización [26], papel que aquí tendrían las asociaciones de víctimas. Otra cuestión que puede surgir es por qué no se investiga también las muertes del otro bando, y es que las mismas ya fueron investigadas por el bando vencedor al terminar la guerra, los restos localizados, e inhumados con los honores correspondientes [27], estimándose un total de 38.563 víctimas en Albacete (920), Alicante (840), Almería (471), Badajoz (1416), Baleares (300), Cáceres (130), Cantabria (1144), Castellón (1031), Cádiz (95), Canarias (0), Cataluña (8352), Ceuta, Melilla, y Norte de África (0), Ciudad Real (2189), Córdoba (2060), Granada (994), Huelva (101), Jaén (1368), Logroño (0), Lugo (0), Madrid (8815), Málaga (2607), Murcia (740), Navarra (0), Orense (0), Salamanca (0), Segovia (0), Sevilla (447), Soria (0), Teruel (1702), Valencia (2844), Valladolid (0), Zamora (0), y Zaragoza (192) [28].

5.2. Las fosas comunes

Con lo que se sabe de fuentes históricas y lo que se ha ido viendo según se han ido abriendo las diferentes fosas encontramos fundamentalmente dos tipos de enterramiento, que vamos a denominar desorganizado y organizado:

- *Fosas comunes desorganizadas*. Son aquellas en las que se enterraron individuos durante la guerra, a medida que el bando vencedor avanzaba por el territorio. Serían zanjas excavadas manualmente, con individuos en hileras y rociados en cal viva, o bien siguiendo el mismo procedimiento en estructuras ya existentes como pozos [29].
- *Fosas comunes organizadas*. A este tipo pertenecen aquellas fosas excavadas con ocasión de las sentencias de la Causa General, por lo que están registradas en los archivos judiciales militares, improvisadas normalmente en cementerios municipales, aunque también cabe encontrarlas en minas, cunetas o cortijos [30].

Con respecto a la localización de las diferentes fosas, tenemos dos fuentes a las que podemos acudir. La primera es el mapa elaborado por el por entonces Ministerio de Justicia, actualmente Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática, cuyos mapas de España y Andalucía podemos ver en las **Figuras 2 y 3**.

Tabla 1. Estimaciones del número de víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra

Comunidad Autónoma/Provincia	Plataforma de Víctimas de Desapariciones Forzadas por el Franquismo [31]	Auto de Garzón [32]	Informe sobre la represión [28]	Ministerio [33]
ANDALUCÍA	29091	32289	-	6677
ALMERÍA	-	373	373	257
CÁDIZ	-	1665	~3071	236
CÓRDOBA	-	7091	9579	206
GRANADA	-	5048	5048 (7000)	194
HUELVA	-	3805	6019	161
JAÉN	-	3253	3040	2043
MÁLAGA	-	7797	7000	2671
SEVILLA	-	3257	11694	909
ARAGÓN	10178	10178	-	12989
HUESCA	-	2061	1519	1960
TERUEL	-	1338	1340	5125
ZARAGOZA	-	6779	6029 (6546)	5904
ASTURIAS	1246	1246	5952	5415
GIJÓN	-	1246	-	-
BALEARES	1777	1777	1300	9
MALLORCA	-	1486	-	-
MENORCA	-	106	-	-
IBIZA Y FORMENTERA	-	185	-	-
CANARIAS	262	262	2000	126
LAS PALMAS	-	200	1000	108
SANTA CRUZ	-	62	1600	18
CANTABRIA	-	850	2535	1043
CASTILLA LA MANCHA	7885	7067	-	4995
ALBACETE	-	1026	~1600	202
CIUDAD REAL	-	1694	~1614	2457
CUENCA	-	377	-	492
GUADALAJARA	-	-	-	1058
TOLEDO	-	3970	3826	786
CASTILLA Y LEÓN	15269	12979	14660	2427
ÁVILA	-	650	1000	91
BURGOS	-	4800	2500 (~1038)	297
LEÓN	-	1250	3000	1603
PALENCIA	-	1180	1500 (~359)	122
SALAMANCA	-	650	1000 (~284)	45
SEGOVIA	-	370	360	124
SORIA	-	287	300	63
VALLADOLID	-	2555	3000	65
ZAMORA	-	1237	2000	17
CATALUÑA	2400	2400	-	8012
BARCELONA	-	-	1716	1753
GIRONA	-	-	519	191
LLEIDA	-	-	450 (750)	1388
TARRAGONA	-	-	703	4680
C. VALENCIANA	28892	4345	-	3311
ALICANTE	-	742	742	432
CASTELLÓN	-	1303	1052	2629
VALENCIA	-	2300	3128	250
PAÍS VASCO	9759	9459	1900	1112
ÁLAVA	-	100	-	635
GUIPÚZCOA	-	340	-	258
VIZCAYA	-	369	-	219
DATOS DEL GOBIERNO VASCO	-	8650	-	-
EXTREMADURA	10266	10266	-	317
BADAJOS	-	-	~7603	153
CÁCERES	-	-	1680	164
GALICIA	4396	4396	3588	205
A CORUÑA	-	-	-	35
LUGO	-	-	-	42
OURENSE	-	-	-	10
PONTEVEDRA	-	-	-	118
LA RIOJA	2007	2007	2241	473
MADRID	2995	2995	2663	12223
MURCIA	855	855	177	1802
NAVARRA	3431	3431	3240	1408
CEUTA, MELILLA y NORTE ÁFRICA	457	464	768	-
CEUTA	-	-	-	2
MELILLA	-	-	-	1
OTROS TERRITORIOS	7	7000	-	-
TOTAL	134405	114266	129472	49558

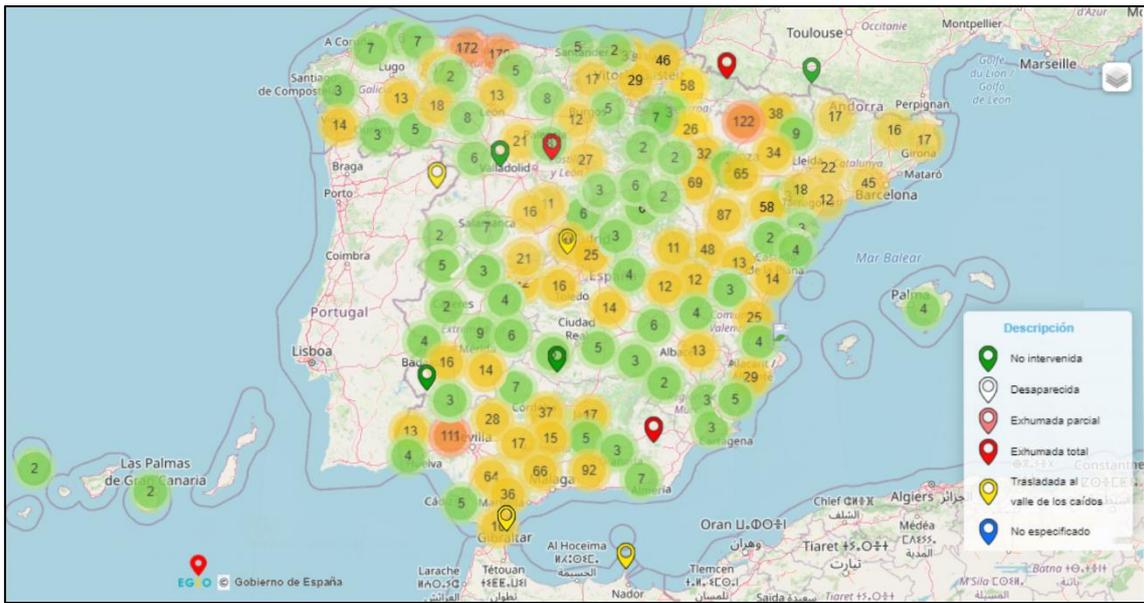


Figura 2. Mapa de las fosas comunes de España [34]

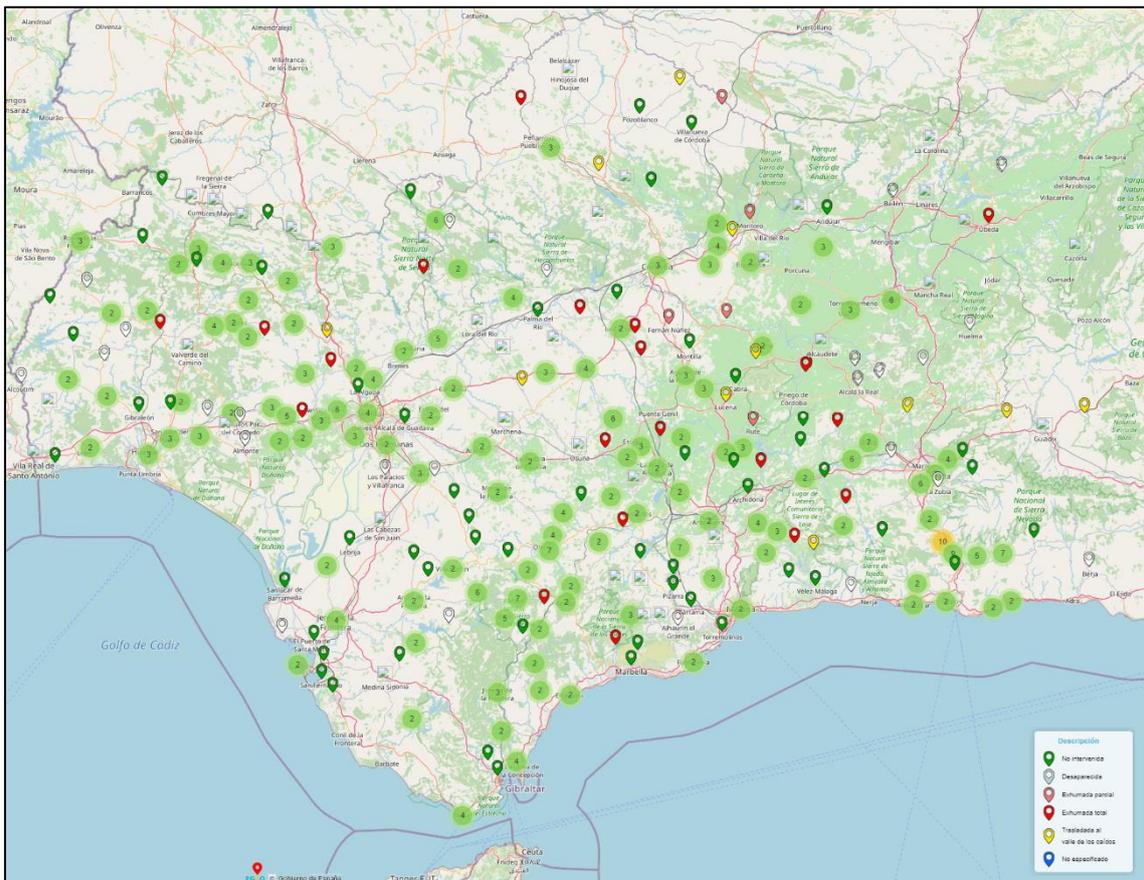


Figura 3. Mapa de las fosas comunes de Andalucía [34]

La otra fuente que podemos consultar es la propia Junta de Andalucía, que ha elaborado su propio mapa de fosas comunes, mucho más detallados que los anteriores. En total se han contabilizado 708 fosas con un número estimado de 45 566 individuos, de las cuales se han localizado 136, exhumado 186, dignificado 152, y dignificado y exhumado 21. La distribución de las mismas puede verse en la **Figura 4**. El 68% de las fosas se encuentra en cementerio interior, localizándose el resto en carretera/camino (9%), vaguada/barranco (5%), zona edificada (3%), cementerio exterior (3%), otras localizaciones (10%) o no definidas (1%) [35]

De un meta estudio realizado con 1762 individuos de 200 fosas diferentes localizadas en distintas comunidades autónomas hasta el año 2015, la mayoría de Castilla y León, se han extrapolado las siguientes *características* de las mismas [36]:

- a) *Número de individuos*. Como media se encuentran 8 individuos, siendo la moda de 1 a 5 individuos en una misma fosa.
- b) *Sexo*. El 86% de los individuos son varones, mientras que el 7% fueron mujeres (el 7% restante no fue posible de determinar).
- c) *Edad*. El 1,48% de los individuos tenía menos de 18 años, el 49,8% tenía entre 18 y 35 años, el 24,3% tenía entre 36 y 50 años, y el 7,5% tenía más de 50 años de edad.
- d) *Altura*. La altura media de los individuos estudiados es de 162,18 cm ($\pm 5,3$ cm).
- e) *Causa de la muerte*. El 80% de los individuos fallecieron por heridas por arma de fuego. De este conjunto, el 79% mostraba un único disparo en la cabeza, y el 21% un patrón de fusilamiento.
- f) *Patologías óseas*. El 41% de los individuos muestra signos en los huesos de estrés ambiental (falta de nutrientes, sobreactividad física, condiciones insalubres).
- g) *Estado de los restos*. En el 78% de los restos de los individuos estudiados se encontraban en un estado de conservación aceptable.
- h) *ADN*. La identificación genética fue posible en 137 individuos (7,77%). Sin embargo, nada se dice de los individuos de los que fue posible obtener un perfil genético aceptable pese a no haberse podido identificar.

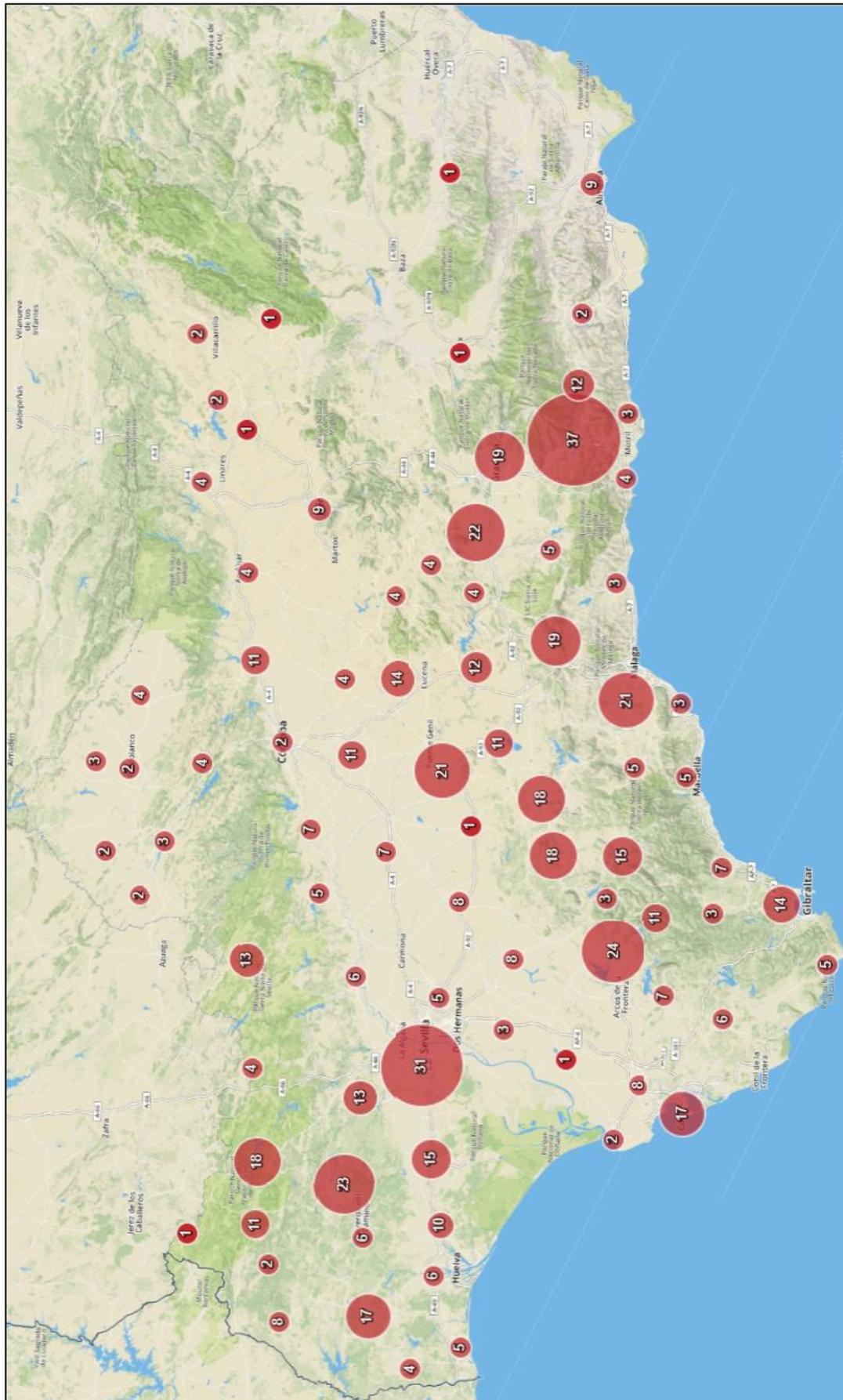


Figura 4. Mapa de fosas comunes de Andalucía [35]

5.3. Marco jurídico aplicable a la memoria histórica y democrática

Así quedaron las cosas hasta que a finales de los años 90 diferentes asociaciones de víctimas de la Guerra Civil se movilizaron por la memoria de las víctimas, lo que desembocaría en la Ley 52/2007, de 26 de diciembre, por la que se reconocen y amplían derechos y se establecen medidas en favor de quienes padecieron persecución o violencia durante la guerra civil y la dictadura, cuya exposición de motivos establece la pretensión de esta Ley de sentar las bases de las políticas públicas para la memoria democrática. Desde la aprobación de esta ley muchas comunidades autónomas aprobaron sus propias leyes de memoria democrática, y más de diez años después la mencionada Ley fue objeto de reforma, aprobándose la Ley 20/2022, de 19 de octubre, de Memoria Democrática. Esta Ley reconoce la competencia de la Administración del Estado en la búsqueda de víctimas, la confección de un mapa integrado de desaparecidos, así como la creación de un *Banco Estatal de ADN de Víctimas de la Guerra y la Dictadura* (artículo 23):

- 1) Creación de una Base Estatal de ADN de Víctimas de la Guerra y la Dictadura, base de datos estatal, adscrita al Ministerio de Justicia. Se compondrá de los perfiles genéticos de los desaparecidos y de sus familiares.
- 2) Aportación de muestras biológicas de los familiares voluntaria y gratuita.
- 3) Colaboración entre el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, los Institutos de Medicina Legal y Ciencias Forenses, y los laboratorios de ADN designados por las comunidades autónomas.
- 4) Inclusión de las personas afectadas por una posible sustracción de niño o niña (*bebés robados*).
- 5) Reglamentación futura del Banco Estatal de ADN.

Con respecto a los diferentes aspectos que veíamos más arriba sobre actuaciones de campo, en este contexto debemos ceñirnos a lo establecido en la Orden PRE/2568/2011, de 26 de septiembre, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de Ministros de 23 de septiembre de 2011, por el que se ordena la publicación en el Boletín Oficial del Estado del *Protocolo de actuación en exhumaciones de víctimas de la guerra civil y la dictadura*, elaborado en base al artículo 12.1 de la Ley 52/2007, de 26 de diciembre, por la que se reconocen y amplían derechos y se establecen medidas a favor de quienes padecieron persecución o violencia durante la guerra civil y la dictadura, y que articula un procedimiento con las siguientes fases:

- A) *Investigaciones preliminares*. Se realizará el estudio de las solicitudes de los familiares de las víctimas, entrevistas a las mismas, elaboración de fichas *ante mortem* de los desaparecidos y datos de los familiares vivos para los estudios de ADN.
- B) *Intervención arqueológica*. Esta fase aglutina el trabajo de arqueólogos, expertos en Antropología Forense y en Medicina Forense, para actuar sobre la fosa en base a las

recomendaciones nacionales e internacionales propia del arte, siguiendo una cadena de custodia de los restos y ajustándose la Orden JUS/1291/2010 del 13 de mayo de remisión de muestras al Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.

- C) *Investigación forense de los restos humanos.* Aquí se realizan los estudios de laboratorio con los objetivos de identificar los restos, diagnosticar la muerte, establecer la etiología médico-legal y la data del fallecimiento, así como las circunstancias de la muerte. Los encargados serán expertos en Antropología Forense, Genética Forense, Patología Forense y Odontología Forense, emitiendo cada uno de ellos el informe correspondiente.
- D) *Informe final.* Se realizará un último informe pericial integrador de las diferentes pericias realizados por los distintos especialistas que han intervenido en el estudio de los restos.
- E) *Destino final de los restos.* Los restos identificados se devolverán a sus familiares para destinarlos a lo que los mismos consideren, y los no identificados se inhumarán en el cementerio municipal que corresponda.

Desarrollando estas disposiciones en el territorio de la comunidad autónoma andaluza está la *Ley 2/2017, de 28 de marzo, de Memoria Histórica y Democrática de Andalucía*, desarrollada con el objetivo de reconocer y ampliar los derechos reconocidos en la Ley de Memoria Histórica, y estructurada en seis títulos: identificación de las víctimas, reparación de las víctimas, documentos de la Memoria Democrática, reconocimiento de la relevancia del movimiento asociativo y fundacional, el Plan Andaluz de Memoria Democrática, y un régimen sancionador. El Título I, relativo a la identificación de las víctimas, regula los siguientes aspectos:

- *Artículo 5. Identificación de las víctimas.* Tendrán consideración especial los familiares de los desaparecidos, los exiliados, las víctimas de tortura, los bebés robados, la guerrilla antifranquista, los reprimidos por su orientación sexual, los reprimidos por cualquier otra causa, las ideologías represaliadas, los funcionarios republicanos, y los privados de libertad durante el franquismo.
- *Artículo 6. Censo de víctimas.* La Consejería competente elaborará un censo de víctimas en el que se anotarán las circunstancias respecto de la represión padecida, del fallecimiento o desaparición, del lugar, y de la fecha de los hechos.
- *Artículo 7. Mapas de localización de restos.* Elaboración de un mapa accesible a todos los ciudadanos de los lugares en los que se ha encontrado o se presume encontrar una fosa.
- *Artículo 8. Localización, exhumación e identificación de las víctimas.* Estas actividades estarán sometidas a autorización administrativa por parte de la Consejería competente.
- *Artículo 9. Procedimiento para actividades de localización, exhumación e identificación de restos.* Se incoará de oficio por parte de la Consejería competente, a solicitud de las autoridades locales, de los familiares de las víctimas, de entidades memorialistas, o de investigadores de la comunidad científica.

- Artículo 10. *Protocolos de actuación para las localizaciones, las exhumaciones e identificaciones de restos.* Se establecerá reglamentariamente un protocolo de exhumación de víctimas que guíe las actuaciones realizadas.
- Artículo 11. *Acceso a los terrenos.* Se podrán ocupar temporalmente los terrenos en los que se hallen o se presuman restos óseos de las víctimas por tratarse de un asunto de interés público.
- Artículo 12. *Hallazgo casual de restos humanos.* Se deberá comunicar inmediatamente a la Administración de la Junta de Andalucía, al Ayuntamiento o a las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado.
- Artículo 13. *Traslado de los restos y pruebas genéticas.* El traslado de los huesos requerirá autorización de la Consejería competente, determinándose reglamentariamente las condiciones en las que los familiares podrán recuperar los restos de sus familiares identificados. La Administración de la Junta de Andalucía realizará pruebas genéticas para la identificación de los restos, estableciendo a tal efecto una base de datos de ADN en colaboración con las universidades públicas de Andalucía en la que se registrarán tanto los datos de los restos óseos exhumados como de los voluntarios que acrediten su condición de familiares de las víctimas.
- Artículo 14. *Denuncia y personación ante los órganos jurisdiccionales.* La Consejería competente denunciará los delitos o indicios de los mismos que se puedan apreciar con ocasión de las localizaciones, identificaciones o en relación con los hallazgos a que se refiere esta ley.

Desarrollando reglamentariamente el artículo 10 y en consonancia con el protocolo nacional, está la Orden de 7 de septiembre de 2009, por la que se aprueba el *Protocolo Andaluz de actuación en exhumaciones de víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra*, que consta de las siguientes fases:

- 1) *Investigaciones preliminares.* Historiadores, documentalistas, entrevistadores y psicólogos tendrán la misión de investigar la historia del caso y la historia local, especialmente a los parientes vivos de las víctimas para posibles comparaciones de ADN.
- 2) *Investigación exhumatoria.* Arqueólogos, antropólogos forenses, médicos tanatólogos e historiadores se encargarán de las tareas de prospección y exhumación de los restos, siguiendo en todo momento una cadena de custodia y el protocolo de la Orden JUS/1291/2010 de remisión de muestras al Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.
- 3) *Investigación forense.* Expertos en Antropología Forense, Genética Forense, Medicina Legal y Forense y Odontología Forense intentarán realizar la identificación, el diagnóstico

de muerte cierta, la etiología médico-legal, la data del fallecimiento, así como las circunstancias de la muerte.

- 4) *Informe final*. Se elaborará un informe completo integrando los informes de los diferentes especialistas que han intervenido en la investigación de los restos.

Con respecto al futuro de las políticas públicas de memoria histórica es menester remitirnos al documento del *I Plan Andaluz de Memoria Democrática 2018-2022*, aprobado por Consejo de Gobierno el 13 de noviembre de 2018. A través de este plan la Junta de Andalucía configura las políticas públicas que pretende implementar en un horizonte de cuatro años, siguiendo los siguientes objetivos generales y específicos:

- A) *Cooperación y coordinación con las administraciones públicas, entidades memorialistas y ciudadanía*.
 - 1) Favorecer mecanismos de cooperación y coordinación
 - 2) Fortalecimiento del tejido asociativo e institucional.
 - 3) Dotar espacios e instrumentos de conocimiento de MD a la ciudadanía
- B) *Reconocimiento institucional y reparación de las víctimas de la Guerra Civil y del franquismo*.
 - 1) Desarrollar medidas reparadoras para las víctimas.
 - 2) Establecer medidas de reconocimiento de las víctimas.
 - 3) Impulsar el reconocimiento de lugares y espacios de duelo y memoria.
- C) *Conocimiento y difusión científica de los hechos y circunstancias, asegurando la preservación de los documentos y favoreciendo la investigación*.
 - 1) Identificación, conservación y difusión de los fondos documentales de memoria democrática.
 - 2) Promover la investigación científica y educativa y la producción audiovisual, para su difusión.

Es dentro del objetivo de reconocimiento institucional y reparación de las víctimas, en concreto en el desarrollo de medidas reparadoras de las víctimas, donde encontramos las siguientes acciones:

1. Localización de fosas.
2. Exhumación y realización de estudios antropológico-forenses.
3. *Identificación mediante comparativas de ADN*. Como indicadores de ejecución tendrá el número de envíos de kits de toma de muestras a los familiares, así como la atención primaria a los mismos, y como indicadores de resultado tendrá el número de personas identificadas y de familiares encontrados.

4. *Banco de ADN*. Como indicadores de ejecución tendrá el número de muestras de individuos y familiares en el banco de ADN, y como indicadores de resultado el número de informes de identificación, ya sean positivas o negativas.
5. Actualización del mapa de fosas.
6. Difusión de los trabajos en las fosas.

La Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN ha elaborado un listado de recomendaciones relativas a la selección de muestras de familiares y de restos óseos, el análisis genético, la garantía de la calidad, y la interpretación de los resultados; estas recomendaciones se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Recomendaciones de la Comisión Nacional del Uso Forense del ADN (CNUFADN) para la identificación genética de víctimas de la Guerra Civil Española [37]

Selección y obtención de muestras de familiares	<ul style="list-style-type: none"> -Supervisada por especialistas para la selección más adecuada del familiar -Conforme a las recomendaciones científicas -Se recomienda el desarrollo de un kit de toma de muestras que incluya el formulario de cadena de custodia y el consentimiento informado -Consentimiento informado: Naturaleza de los perfiles de ADN, uso y cesión de perfiles de ADN, capacitación del laboratorio, conservación de las muestras, derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición. -Registro electrónico centralizado (expediente único para cada grupo familiar)
Selección y obtención de muestras de restos óseos	<ul style="list-style-type: none"> -Seguir los procedimientos de exhumación recomendados -Estudio antropológico previo -Condiciones que aseguren la integridad de la muestra y minimicen la posible contaminación -Si es posible, dos piezas dentales y una muestra de tejido compacto de diáfisis de hueso largo -Conservación adecuada de las muestras para evitar su degradación -Formulario de toma de muestras <i>post-mortem</i> -Empaquetado y transporte de la muestra que garantice su conservación -Registro centralizado
Análisis de ADN	<ul style="list-style-type: none"> -STRs autosómicos (los recomendados por la Unión Europea y CODIS) -Según la relación de familiaridad: Y-STRs, X-STRs y ADN mitocondrial -En restos óseos: mini STRs y ADN mitocondrial -Futuro uso de la tecnología de secuenciación masiva en paralelo (MPS)
Garantía de calidad	<ul style="list-style-type: none"> -Acreditación bajo la norma EN ISO/IEC 17025 -Creación de una red de laboratorios
Base de datos nacional de ADN	<ul style="list-style-type: none"> -Creación de una base de datos nacional de ADN -Garantía del intercambio de información entre nodos autonómicos, búsqueda de perfiles mediante algoritmos de identidad, búsquedas por árbol familiar, sistema estadístico y sistema de gestión de coincidencias

	-Sistemas recomendados: CODIS, Bonaparte, M-FISys -Cumplimiento de lo dispuesto en materia de protección de datos
Interpretación	-Valoración estadística mediante LR -Utilización de bases de datos poblacionales adecuadas -Utilizar marcadores adicionales a los STRs autosómicos -Valorar obtener muestra de otros familiares -Informes de identificación siguiendo las recomendaciones de la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN

6. El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada

Vistos los problemas a los que se enfrenta el analista con el ADN antiguo, se publicó una lista con diez *criterios* para tratar de obtener la máxima fiabilidad en los resultados que se pudieran obtener [5,20]: trabajar en un área físicamente aislada a la de las muestras de referencia, control positivo y negativo de amplificación de la PCR, comportamiento molecular acorde al estado de degradación en el que cabe esperar hallar el ADN, cuantificación del extracto, reproducibilidad de los resultados, clonación de los productos de PCR, repetitividad de los resultados, preservación bioquímica, estudio de restos asociados para el control del ADN exógeno, y sentido filogenético.

El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada trabaja desde su creación en 1990 en el estudio de las últimas tecnologías de análisis de ADN, complementando así una labor investigadora con su labor docente, y cuenta con el equipamiento adecuado para el cumplimiento de los requisitos para trabajar con ADN antiguo [5]. En 1998 desarrolló en conjunto con la Guardia Civil el Programa Fénix [6], cuyo objetivo era la identificación de restos óseos sin identificar cotejándolos con una base de datos de STR y ADN mitocondrial de familiares por vía materna. En 2004 creó el Programa DNA-Prokids [7], financiado por la Universidad de Granada y diversas fundaciones, y actualmente en funcionamiento, cuyo objetivo es la lucha contra el tráfico de menores mediante la creación de bases de datos de ADN de familiares de menores desaparecidos y menores hallados en situación irregular.

En 2018 firmó el Convenio con la Junta de Andalucía para la Identificación de las víctimas de la Guerra Civil y de la Posguerra, con el objetivo de crear una base de datos de ADN para toda Andalucía, con la que poder cotejar los perfiles genéticos de los descendientes de las víctimas con los perfiles de ADN de los diferentes restos óseos hallados en las fosas. Si bien muchas veces puede obtenerse un resultado de un hueso, son muchas también las ocasiones en las que no es posible obtener un perfil, problemática en la que se enmarca esta tesis con la intención de diseñar un modelo predictivo para establecer la vía analítica preferente en función del estado en el que se hallen los restos óseos con los que se va a trabajar. Hasta la fecha, 2097 muestras de familiares y 3347 muestras de restos óseos se han analizado en un total de 70 casos (véase la **Figura 5**).

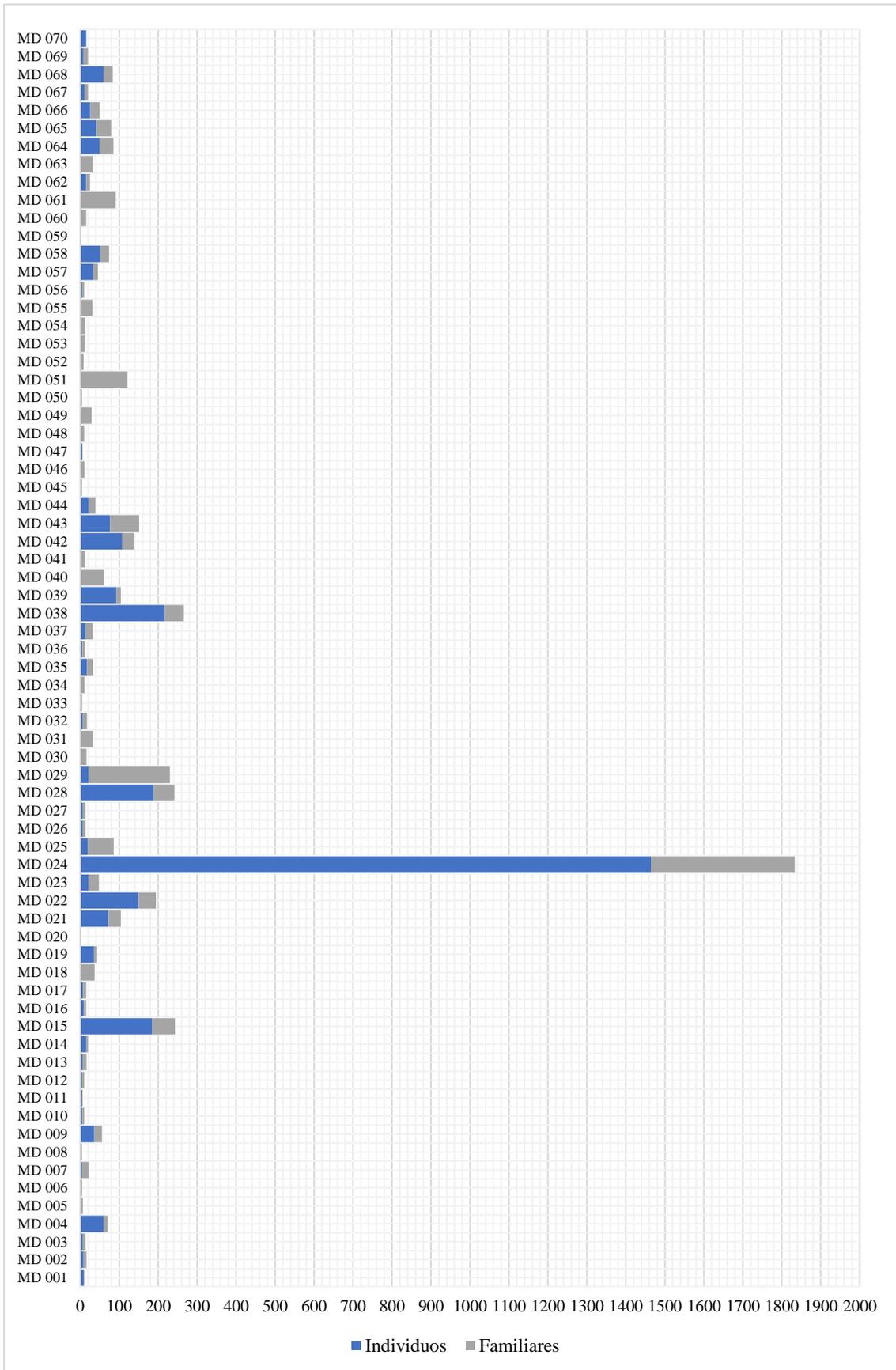


Figura 5. Muestras de individuos y familiares analizadas por fosa

7. Referencias

- [1] J.A. Lorente, C. Entrala, J.C. Álvarez, M. Lorente, E. Villanueva, F. Carrasco, B. Budowle, Missing Persons Identification: Genetics at Work for Society, *Science*. 22 (2000) 2257–2258.
- [2] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Academic Press, San Diego, 2010.
- [3] C. Børsting, N. Morling, Next generation sequencing and its applications in forensic genetics, *Forensic Science International: Genetics*. (2015) 78–89.
- [4] M.J. Álvarez-Cubero, M. Saíz, B. Martínez-García, S.M. Sayalero, C. Entrala, J.A. Lorente, L.J. Martínez-González, Next generation sequencing: an application in forensic sciences?, *Annals of Human Biology*. (2017) 1464-5033 (Online).
- [5] H.N. Poinar, The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples, *International Congress Series* 1239. 1239 (2003) 575–579.
- [6] J.A. Lorente, C. Entrala, J.C. Alvarez, B. Arce, B. Heinrichs, M. Lorente, F. Carrasco, B. Budowle, E. Villanueva, Identification of Missing Persons: The Spanish “Phoenix” Program, *Croatian Medical Journal*. 42 (2001) 267–270.
- [7] M.J. Alvarez-Cubero, L.J. Martínez-González, J.C. Álvarez, A.J. Eisenberg, B. Budowle, J.A. Lorente, Genetic Identification of Missing Persons: DNA Analysis of Human Remains and Compromised Samples, *Pathobiology*. 79 (2012) 228–238.
- [8] F. de Antón y Barberá, J.V. de Luis y Turégano, *Policía Científica Volumen I & II, 5ª Edición*, Tirant Lo Blanch, Valencia, 2012.
- [9] Sung Tz’u, *The Washing away of Wrongs: Forensic Medicine in Thirteenth-Century China*, Centre for Chinese Studies Publications, Stellenbosch, 1981.
- [10] R. Dahm, Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research, *Human Genetics*. 122 (2008) 565–581. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0433-0>.
- [11] R.E. Franklin, R.G. Gosling, Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium desoxy-ribonucleate, *Nature*. 171 (1953) 742.
- [12] M.M.K. Nass, S. Nass, Intramitochondrial fibers with DNA characteristics, *The Journal of Cell Biology*. 19 (1963) 593–611.
- [13] M.M. Nass, The circularity of mitochondrial DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 56 (1966) 1215–1222.
- [14] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction, in: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986: pp. 263–273.
- [15] O. Ouchterlony, Antigen-antibody Reactions in Gels, *Acta Pathol Microbiol Scand*. 26 (1949) 507–515.
- [16] BBC, DNA pioneer’s “eureka” moment, (2009).
- [17] P. Gill, A.J. Jeffreys, D.J. Werret, Forensic application of DNA “fingerprints,” *Nature*. 318 (1985) 577–579.
- [18] A.J. Jeffreys, M.J. Allen, E. Hagelberg, A. Sonnberg, Identification of the skeletal remains of Josef Mengele, *Forensic Science International*. 56 (1992) 65–76.
- [19] A. Brüel, E.I. Christensen, J. Tranum-Jensen, K. Qvortrup, F. Geneser, *Histología, 4ª Edición*, Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2012.
- [20] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic Analyses from Ancient DNA, *Annual Review of Genetics*. 38 (2004) 645–679.
- [21] Pinakhina, Darya, Chekunova, Elena, The conceptual landscape of ancient DNA research: current state and future prospects, *International Journal of Conservation Science*. 11 (n.d.) 703–714.
- [22] S. Hummel, Ancient DNA, in: W. Henke, I. Tattersall (Eds.), *Handbook of Paleoanthropology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015: pp. 763–790. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39979-4_21.
- [23] O’Rourke, D.H., Carlyle, S.W., Parr, R.L., Ancient DNA: Methods, progress, and perspectives, *American Journal of Human Biology*. 8 (1996) 557–571. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6300\(1996\)8:5%3C557::AID-AJHB2%3E3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6300(1996)8:5%3C557::AID-AJHB2%3E3.0.CO;2-T).
- [24] J.A. Blanco Rodríguez, La historiografía de la guerra civil española, *HISPANIA NOVA. Revista de Historia Contemporánea*. 7 (2007) 1–33.
- [25] J. Valdeon, J. Pérez, S. Julia, *Historia de España*, Espasa Calpe Mexicana, Madrid, 2003.
- [26] A. García-Pablos de Molina, *Tratado de Criminología*, Tirant Lo Blanch, Valencia, 2014.
- [27] F. Ferrándiz, Fosas comunes, paisajes del terror, *Revista de Dialectología y Tradiciones Populares*. LXIV (2009) 61–94.

- [28] Espinosa Maestre, Francisco, Informe sobre la represión franquista. Estado de la cuestión, (2008). https://15mpedia.org/w/images/b/b5/Informe_sobre_la_represi%C3%B3n_franquista%2C_estado_de_la_cuesti%C3%B3n.pdf.
- [29] E. Silva, S. Macías, Las fosas de Franco, Booket, Madrid, 2011.
- [30] F. Espinosa Maestre, J.M. García Márquez, P. Gil Vico, J.L. Ledesma, Violencia roja y azul España, 1936-1950, Barcelona, 2010.
- [31] Europa Press Nacional, Memoria.- Las asociaciones presentan a Garzón un listado único con los nombres de más de 133.000 víctimas, (2008). <https://www.europapress.es/nacional/noticia-memoria-asociaciones-presentan-garzon-listado-unico-nombres-mas-133000-victimas-20081006141939.html>.
- [32] Garzón, Baltazar, 2008. TOL1.375.692.
- [33] Ministerio de la Presidencia Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática, Buscador de víctimas, (2020). <https://www.mpr.gob.es/memoriademocratica/mapa-de-fosas/Paginas/buscadorvictimas.aspx>.
- [34] Ministerio de la Presidencia Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática, Buscador de mapa de fosas georreferenciado, Ley de La Memoria Histórica. (2020). <https://www.mpr.gob.es/memoriademocratica/mapa-de-fosas/Paginas/buscadormapafosas.aspx> (accessed April 20, 2020).
- [35] Junta de Andalucía, Mapa de fosas, Consejería de Cultura y Patrimonio Histórico. (2020). <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/culturaypatrimoniohistorico/areas/memoria-democratica/fosas/mapas-fosas.html> (accessed April 23, 2020).
- [36] F. Serrulla Rech, Antropología Forense de la Guerra Civil Española, Universidad de Granada, 2018.
- [37] Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN (CNUFADN), Recomendaciones sobre los estudios de identificación genética de la Guerra Civil Española. Creación de una Base de Datos Nacional de ADN de la Memoria Histórica, (2022). <https://www.mjusticia.gob.es/es/ElMinisterio/OrganismosMinisterio/Documents/Recomendaciones%20sobre%20los%20estudios%20de%20identificacion%20gen%C3%A9tica%20en%20v%C3%A1ctimas%20de%20la%20guerra%20civil%20espa%C3%B1ola.pdf>.

Capítulo 1. La muestra de restos óseos



¿Cuántas veces le he dicho que cuando se han descartado todas las demás posibilidades, la restante, por improbable que parezca, tiene que ser cierta?

Sherlock Holmes, El signo de los cuatro.



Resumen: Huesos y dientes son el único material biológico capaz permanecer durante largos periodos de tiempo; sin embargo, condiciones ambientales como la temperatura, la humedad, o el pH, afectan a la preservación del ADN, lo que hace este tipo de muestras especialmente desafiantes para los laboratorios forenses. Este capítulo tiene el objetivo de hacer una revisión de las características de hueso y diente, de los lugares en los que pueden encontrarse y qué factores afectan a la preservación del ADN. Finalmente, se hace una investigación en la que se compara el rendimiento del hueso petroso, de los dientes, del fémur, y de la tibia, en un total de 88 muestras de 38 individuos diferentes, utilizando datos de cuantificación y del perfil genético obtenido. El hueso petroso supera al resto en términos de cuantificación, ofreciendo también perfiles genéticos más informativos en términos de calidad de los resultados.

Palabras clave: ADN degradado; Hueso petroso; Restos humanos; Restos óseos

Abstract: Bones and teeth are the only biological material capable of enduring for long periods of time; however, environmental conditions such as temperature, humidity, or pH affect DNA preservation, making these types of samples particularly challenging for forensic laboratories. This chapter aims to review the characteristics of bone and teeth, the places where they can be found, and the factors that affect DNA preservation. Finally, an experiment is conducted comparing the performance of petrous bone, teeth, femur, and tibia in a total of 88 samples from 38 different individuals, using quantification data and the obtained genetic profile. The petrous bone outperforms the others in terms of quantification, providing more informative genetic profiles in terms of result quality.

Keywords: DNA degradation; Human remains; Petrous bone; Skeletal remains

1. Características del hueso

Si el hueso y el diente van a ser el objeto de nuestro análisis, es obligatorio conocer sus características, tanto a nivel macro como a nivel micro, lo que nos va a permitir conocer mejor la magnitud del problema analítico, así como para entender el porqué de las técnicas que veremos posteriormente. Es por ello que vamos a hacer un análisis en tres niveles: anatómico, histológico y citológico.

1.1. Características anatómicas

Huesos y articulaciones forman los elementos pasivos del aparato locomotor, teniendo diferentes formas en función de su función y de su localización. Macroscópicamente podemos distinguir dos partes diferentes: el **hueso cortical o compacto**, localizado en la superficie de los mismos, y una malla tridimensional o **hueso esponjoso**, hallado en el interior de los huesos planos y cortos, y en la epífisis y metáfisis de los huesos largos, en cuyas oquedades se encuentra la médula ósea. En los huesos del cráneo al hueso compacto se le llama tabla externa e interna, y entre ellas se localiza el hueso esponjoso o diploe. Los diferentes huesos del cuerpo humano son [1], como se muestra en la **Figura 1**:

- 1) *Huesos largos*. En ellos se distinguen un cuerpo central o diáfisis y dos extremos o epífisis, localizándose en la diáfisis la cavidad medular. Son huesos largos el fémur, la tibia, el peroné, el húmero, el cúbito, o el radio.
- 2) *Huesos planos*. Están compuestos por dos láminas, externa e interna, de hueso compacto, separadas por hueso esponjoso, llamado diploe en el cráneo. Son huesos planos el frontal, el parietal, el occipital, el temporal, el esfenoides, o la escápula.
- 3) *Huesos cortos*. Una cubierta de hueso compacto rodea el tejido esponjoso, componente principal de estos huesos. Son huesos cortos los del carpo, como el grande.
- 4) *Huesos irregulares*. Comprenden los huesos que no se pueden clasificar en los grupos anteriores, como es el caso de las vértebras.
- 5) *Huesos neumáticos*. Estos huesos del cráneo poseen cavidades que en el vivo están recubiertas de mucosa y que contienen aire, como son el etmoides o el maxilar.
- 6) *Huesos sesamoideos*. Fundamentalmente se encuentran en el esqueleto de la mano y el pie, aunque también pueden formarse en el interior de los tendones, como la rótula.

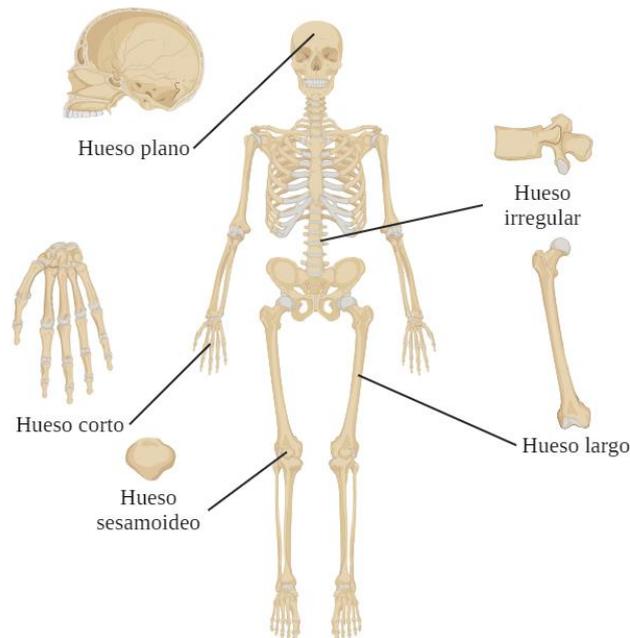


Figura 1. Tipos de hueso del cuerpo humano. Editado con Biorender

Los *dientes* se articulan en los alveolos del maxilar y de la mandíbula, contactando unos con otros sin espacios intermedios. El ser humano nace con una dentición temporal o decidua de 20 dientes que van erupcionando a los 6 meses de edad, siendo sustituidos a partir de los 7 años aproximadamente por los 32 dientes de la dentición permanente. En cada diente se distinguen tres partes: corona, cuello y raíz, que es la que se fija en el alveolo. Hay diferentes dientes cuya forma precede a su función [2], como se muestra en la **Figura 2**:

- Incisivos.* Tienen forma de escoplo con un borde horizontal filado, sirviendo para cortar.
- Caninos.* Tienen un borde cortante y una única raíz, ocupándose de desgarrar.
- Premolares.* Tienen dos elevaciones en punta o cúspides en su corona, hendidas en los superiores y únicas en los inferiores.
- Molares.* Tienen cuatro cúspides y tres (superiores) o dos (inferiores) raíces, ejecutando el trabajo masticatorio con los premolares.

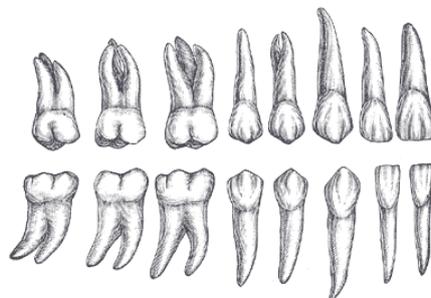


Figura 2. Tipos de dientes humanos, de izquierda a derecha: tres pares de molares, dos de premolares, uno de caninos y dos de incisivos. Fuente: Wikipedia.

1.2. Características histológicas

El tejido óseo es una especialización del tejido conectivo denso, componiéndose, igual que el cartílago, de células embebidas en una matriz extracelular, surgiendo su dureza y resistencia características de la calcificación de esta. El tejido óseo nace como tejido cartilaginoso cuya matriz extracelular es calcificada por los osteoblastos hasta formar el tejido óseo propiamente dicho, ya sea desde el tiempo fetal o a partir de un molde de cartílago. Las principales funciones del tejido óseo son las de sostén y protección, amén de la homeostasis por acaparar casi todo el calcio del organismo [3].

El *tejido óseo cortical* está formado histológicamente por osteonas corticales o *Sistemas de Havers*, cilindros dispuestos longitudinalmente de unos 150 μm de diámetro con un hueco central de 1/3 de su longitud llamado conducto de Havers (**Figura 3**), que contiene fibras nerviosas y tejido conectivo. Alrededor de este conducto se disponen aproximadamente 15 laminillas de forma concéntrica, formadas mayormente por colágeno tipo I. Bajo el periostio y el endostio encontramos también laminillas circunferenciales externas e internas, paralelas a la superficie externa e interna del hueso compacto. El *tejido óseo esponjoso* está formado también por laminillas en forma de osteonas trabeculares, constituidas por unas 20 laminillas en forma de disco de unos 60 μm de espesor, dispuestas en función de la carga que tiene que soportar el hueso. El *periostio* se compone de una capa de tejido conectivo laxo y otra de tejido conectivo denso, y el *endostio* de una fina capa de células planas de revestimiento óseo. La *matriz ósea extracelular* se compone de una matriz orgánica, formada fundamentalmente por colágeno tipo I, y otra inorgánica de sales de calcio. La matriz inorgánica constituye alrededor del 75% del peso de un individuo adulto, y está formada mayormente por cristales de hidroxapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, con cristales en forma de varas o placas [3], que es finalmente la responsable de la dureza y resistencia del hueso, y por ende, de su duración en el tiempo como indicio.

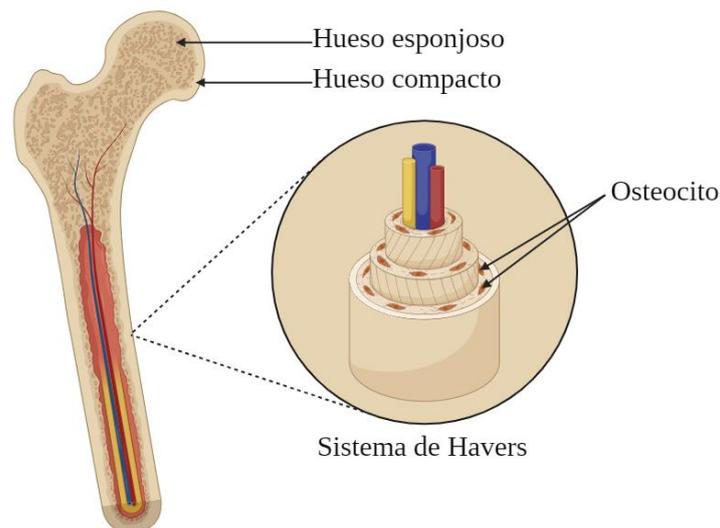


Figura 3. Sistema de Havers. Editado con Biorender

La histogénesis del diente se inicia como un engrosamiento del epitelio de maxilares y mandíbula hacia la séptima semana de gestación, que forma dos crestas de las cuales la externa da origen a la cavidad bucal, y la otra a los dientes. Este epitelio prolifera y forma varios engrosamientos, los gérmenes dentales. Con respecto a los dientes (**Figura 4**), ya vimos que los mismos se componen macroscópicamente de corona y raíz, pero en su interior se encuentra la *cavidad pulpar*, que contiene numerosas ramificaciones vasculares y nerviosas incluidas en tejido conectivo laxo, cuyo conjunto forma la pulpa dental, que emite una prolongación en cada raíz [3]. El tejido dental duro, por su parte, está formado por la dentina, el esmalte y el cemento. La *dentina* constituye la mayor parte del diente y rodea la cavidad pulpar, siendo más gruesa en la corona, donde se encuentra rodeada de *esmalte*. En la zona de la raíz, la dentina está recubierta por una delgada capa denominada cemento. Esmalte y dentina se componen fundamentalmente de colágeno tipo I y cristales de hidroxiapatita, diferenciándose en su composición (70% de hidroxiapatita en la dentina frente al 96% del esmalte) y en la disposición de la misma (el esmalte al mineralizarse forma prismas de esmalte), haciendo que el esmalte sea la sustancia más dura del organismo.

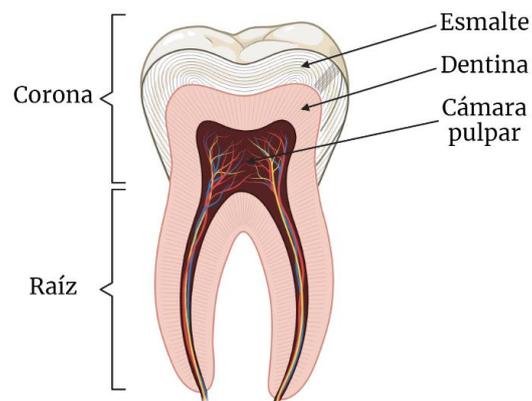


Figura 4. Esquema histológico del diente. Editado con Biorender

1.3. Características citológicas

Las características anatómicas e histológicas de huesos y dientes nos hacen entender por qué se conservan, aunque hayan pasado periodos de tiempo relativamente largos desde la muerte del individuo, pero, estas características son las que hacen que también se conserve el ADN.

En el tejido óseo cortical los sistemas de Havers tienen lagunas en las que están incluidas las células óseas. Por lo tanto, el ADN de sus núcleos va a estar protegido de la descomposición por laminillas de hidroxiapatita. Son cuatro las células que mantienen el hueso [4], como puede verse en la **Figura 5**:

- 1) *Células osteoprogenitoras*. Forman una población de células madre que puede diferenciarse en osteoblastos y osteocitos. En el hueso maduro forman células fusiformes aplanadas que revisten la superficie ósea.
- 2) *Osteoblastos*. Sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea, fabricando colágeno tipo I, glucosaminoglucanos y proteoglucanos.
- 3) *Osteocitos*. Algunos osteoblastos son rodeados por matriz ósea mineralizante y quedan encerrados en las lagunas de los sistemas de Havers. Se sospecha que tienen la función de mantener la matriz ósea.
- 4) *Osteoclastos*. Células grandes multinucleadas que erosionan el hueso mineralizado. Se hallan adheridos a la superficie ósea en zonas de resorción ósea activa.

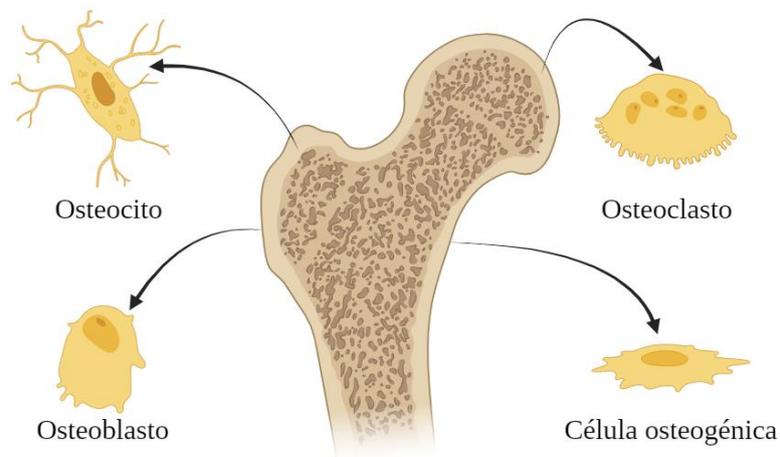


Figura 5. Células del tejido óseo. Editado con Biorender

La superficie externa de la cámara pulpar, por su parte, está cubierta de *odontoblastos*, células productoras de dentina (**Figura 6**). Esta acción es progresiva a lo largo de la vida del individuo, y es por ello que el tamaño de la cámara pulpar se va reduciendo conforme se envejece. Otros componentes celulares de la cavidad pulpar son los *fibroblastos*, que sintetizan y mantienen la matriz acelular de la pulpa, así como células endoteliales de los vasos sanguíneos y ramas nerviosas [4].

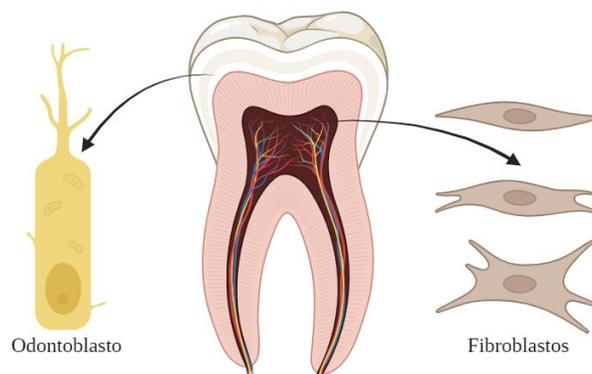


Figura 6. Células del tejido dental

2. El proceso de reducción esquelética

Si tenemos que recurrir al estudio del ADN de los huesos es porque no queda ningún otro indicio como músculo o sangre, por lo que resulta interesante estudiar el proceso de descomposición.

La *putrefacción* es un proceso de fermentación desempeñado fundamentalmente por la flora bacteriana del cuerpo que actúa sobre sus principios orgánicos y que conduce a la desaparición del cadáver, dejando únicamente los componentes calcáreos. En primer lugar actúan las bacterias aerobias (*Bacillus subtilis*, *B. fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *B. coli*), desarrollándose a continuación las bacterias aerobias facultativas (*B. putrificus coli*, *B. liquefaciens magnus*, *Vibrio septicus*), para finalmente dar paso a las bacterias anaerobias (*B. perfringens*, *B. putridus gracilis*, *B. magnus anaerobius*, *Clostridium sporogenes*). También auxilian insectos, roedores, mamíferos y aves, en un proceso que hace que el cadáver pase por las siguientes fases [5]:

1. *Periodo cromático*. Se inicia con el primer síntoma de la putrefacción, la mancha verde en la fosa ilíaca derecha, que se extiende posteriormente a todo el cuerpo, hacia las 24 horas de la muerte.
2. *Periodo enfisematoso*. Se desarrollan una gran cantidad de gases que deforman el cadáver y se llenan los vasos sanguíneos superficiales de forma visible, en un proceso que dura desde varios días a un par de semanas.
3. *Periodo colicuativo*. La epidermis se despegaba de la dermis produciendo ampollas, se desprenden uñas y pelos y se instaura la licuefacción, en un proceso que puede durar de 8 a 10 meses.
4. *Periodo de reducción esquelética*. Todas las partes blandas irán desapareciendo por su licuación. Los elementos más resistentes son los fibrosos, por lo que el esqueleto permanecerá unido hasta que finalmente estos se descompongan también: la cabeza se desprende del tronco, caen las costillas y el esternón, en un proceso de entre 2 y 3, o hasta 5 años. El tiempo requerido para la reducción esquelética es muy variable, debido a que es un proceso complejo en el que intervienen muchos factores. Para arrojar algo de luz se han hecho algunos estudios, la mayoría con animales en descomposición, y la mayoría apuntan a una mayor velocidad de esqueletización cuando la temperatura y la humedad son altas (1-2 semanas), importando también si el cuerpo está enterrado o al aire (más rápida), y ocurre antes en las estaciones cálidas. En definitiva, es un proceso que puede durar desde 3 días en ambientes cálidos, húmedos y con abundancia de insectos, hasta miles de años si media congelación [6].

Se ha visto que la descomposición es mucho más lenta cuando el cadáver está enterrado que cuando el cadáver está al aire libre o sumergido, y más si se entierra antes de que se inicie la putrefacción, debido a que no está expuesto al aire, la temperatura es menor, y no hay

depredadores que diseminen los restos. El tipo de suelo y profundidad a la que se entierra también influye: es más rápida en suelos húmedos, porosos, o en enterramientos superficiales. Más influencia tiene la topografía del terreno, aumentando la velocidad de la putrefacción si se entierra en un valle o bajo el nivel del mar, por acción del agua. Los cuerpos enterrados en ataúd se descomponen más lentamente (menos temperatura, menos aire, menos agua), y todavía más si el ataúd es de zinc o cobre que si es de madera laminada [6]. Lo que sí se sabe es que los insectos (*Coleoptera* y *Dermestidae*) parecen acelerar enormemente la putrefacción y la esqueletización, sobre todo si están presentes en un ambiente que les es propicio, como es el húmedo y cálido [7].

3. Estudio antropológico-forense del esqueleto

Previo a cualquier estudio de ADN, dada su naturaleza destructiva, es imperativo hacer un estudio antropológico de los restos, pues son muchos los datos que pueden obtenerse del esqueleto: sexo, edad, patologías, características anatómicas, que pueden (y de hecho lo hacen) orientar mucho mejor el análisis de ADN. Además, determinadas características del esqueleto pueden influir en el ADN que puede obtenerse del mismo, como veremos a continuación.

3.1. Estimación del sexo en el esqueleto

Para la estimación del sexo del individuo por su esqueleto se cuenta con diferentes métodos, como son las diferentes características morfológicas del cráneo o de la pelvis o las funciones discriminantes. Estos métodos tienen en común la premisa de que los huesos de individuos femeninos son en promedio de menor tamaño que los masculinos, que son más grandes y pesados, con inserciones musculares más robustas [8].

El hecho de que los huesos de varón sean más grandes y pesados puede hacernos pensar, primero, que habrá más cantidad de ADN en los mismos (a mayor cantidad de hueso, mayor número de Sistemas de Havers, y mayor número de osteocitos), y segundo, que resistirán mejor el paso del tiempo.

3.2 Estimación de la edad en el esqueleto

Para la estimación de la edad en el esqueleto se cuentan nuevamente con diferentes métodos: cierre de suturas craneales, epífisis esternal de las costillas, faceta auricular de la pelvis, cambios en la sínfisis púbica, histomorfometría, desgaste dental, anulación de cemento dental o translucidez de la raíz. Generalmente, los antropólogos utilizan sistemas de comparación de diferentes indicadores del esqueleto, lo que permite determinar la edad biológica del mismo, pero no así la edad cronológica, que está influenciada por factores como la ancestralidad, la estructura social de la población, la ontogénesis o diferente velocidad de desarrollo, las influencias genéticas, las enfermedades, el estrés ocupacional, la actividad física, el medio ambiente, o la alimentación, por lo que la determinación de la edad biológica siempre estará sujeta a error [9]. Estos métodos se basan en los cambios constructivos u osteogénicos que tienen lugar en la

estructura ósea del individuo desde que nace hasta que es adulto, siendo los cambios a partir de entonces destructivos u osteolíticos hasta que el individuo es senil [10].

Es por ello que podemos pensar que se obtendrá mayor cantidad de ADN (y/o que este se conservará mejor) en individuos adultos que en individuos juveniles, en los que el hueso no está completamente formado, por lo que se conservará peor, y que en individuos seniles, por la degradación ósea que estos puedan presentar, lo que nos lleva a pensar en la importancia de la presencia de patologías en el individuo. A este respecto, un estudio encontró una mejor preservación del ADN de los dientes de individuos de más edad, al estar las piezas dentales más mineralizadas [11].

3.3. Estimación de patologías en el esqueleto

Otro de los campos de actuación de la Antropología Física y Forense es la estimación de patologías en el individuo, no ya traumas *peri mortem*, sino *ante mortem*, característicos del individuo que permitan su individualización o bien permitan la caracterización de una población o grupo social. De entre las diferentes patologías la que más puede interesarnos en nuestro caso es la osteoporosis, una enfermedad metabólica que se caracteriza por la reducción de masa ósea, sobre todo del hueso esponjoso, en edades avanzadas, registrada particularmente en mujeres, y que se manifiesta con un aumento de fracturas óseas y deformación de los cuerpos vertebrales. La osteoporosis muestra un avance progresivo en los huesos largos, desde una esclerosis en el borde hasta tener aspecto de “comido por polillas” [12].

Teniendo esto en cuenta, la osteoporosis puede suponer un nuevo hándicap para el analista, y es que la pérdida de masa ósea ocasionará que el hueso se conserve mucho peor, provocando incluso su mayor fragmentación, con su consiguiente pérdida.

4. Formas de enterramiento

Ahora que sabemos lo que estamos buscando, veamos dónde buscarlo; es decir, examinemos las diferentes posibilidades en las que cabe hallar los restos. La primera y más evidente es la posibilidad de que los restos óseos estén en un cementerio, ya sea una fosa en la tierra o en un nicho. No obstante, la mente criminal siempre nos sorprende, por lo que debemos examinar otras posibilidades en las que cabe hallar los restos, como son su enterramiento en cal viva o ácido, su incineración, o su enterramiento en una fosa común.

4.1. Enterramiento en cementerio

En primer lugar, veamos qué es *lo normal*. Y con esto nos referimos a que la muerte, natural, accidental, o violenta, del individuo está judicializada o pasa por el diagnóstico de muerte cierta de un médico. Nos remitimos al Reglamento de la Policía Mortuoria, el Decreto 2263/1974, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Policía Sanitaria Mortuoria. En los mismos términos se expresa el Decreto 95/2001, de 3 de abril, por el que se aprueba el Reglamento de

Policía Sanitaria Mortuoria de Andalucía. En su artículo 40 regula los féretros, estableciendo como común el féretro construido con tablas de madera de 15 mm de espesores unidas sin aberturas entre ellas, cuya tapa encaje en el cuerpo inferior del mismo, los cuales se dispondrán, como establece el artículo 54, en fosas y nichos.

- Las *fosas* serán de dos metros, separadas otros dos metros entre sí, con 80 cm de ancho.
- Los *nichos* serán de 0,75 metros de ancho, 0,60 metros de alto y 2,50 metros de profundidad, contemplando unas medidas de 0,50x0,50x1,60 metros para los niños, con una separación vertical de 0,28 metros y en horizontal de 0,21 metros. Se taparán con un doble tabique.

Cuestión a parte son los enterramientos clandestinos, aunque *a priori*, salvo los casos que veremos a continuación, no ofrecen dificultades analíticas adicionales más allá del terreno, nos obligan a hablar también de la adipocera. La adipocera es una sustancia cremosa y grisácea formada por la hidrólisis de los triglicéridos naturalmente presentes en el cuerpo en glicerina y ácidos grasos, palmítico y esteárico mayormente, capaz de penetrar en los tejidos y cuya formación está relacionada con la humedad propia del suelo [13]. Se forma en condiciones anaerobias con temperatura cálida y pH ligeramente alcalino, y las bacterias *Clostridium* favorecen su aparición, teniendo utilidad forense por favorecer la conservación de los restos, establecer el intervalo *post mortem* [14] y ayudar en la localización de los mismos en el terreno. En avanzados estados de descomposición puede ser difícil obtener ADN de los pocos tejidos que puedan quedar, sin embargo, se ha visto que es posible en muchas ocasiones obtener ADN de la víctima de la propia adipocera [15], por lo que no debe desdeñarse su utilidad, tanto en la estimación del intervalo *post mortem* como de fuente de ADN.

4.2. Enterramiento en cal viva

Está expresamente prohibido revestir los nichos con cemento hidráulico o sustancias impermeables. Pero, es una práctica habitual de las funerarias el poner un lecho de grava y *cal viva*. Es frecuente leer en los periódicos que el criminal entierra los cadáveres esparciendo *cal viva* para eliminar los cuerpos y borrar las evidencias que pueda haber en los mismos, lo cual es un mito a medias. En experimentos con cerdos se ha visto que a corto plazo (seis meses) el efecto es el contrario: al ser un desecante, la *cal viva* preserva los cadáveres sin descomponer más tiempo [16]. El mismo experimento a los 42 meses no mostraba grandes diferencias entre enterramientos con *cal viva* y sin ella, salvo una ligera mejor preservación de los tejidos superficiales. Lo que sí que es cierto es que se vio que vuelve muy alcalino el pH del suelo, favoreciendo la proliferación de bacterias aerobias [17].

Por un lado, se ha visto que un pH más alcalino favorece la preservación de los restos óseos al impedir la disolución del calcio de la matriz ósea [18]. Pero, como veremos más adelante, un pH alcalino rompe los puentes de hidrógeno que se establecen entre las cadenas de ADN,

desnaturalizándolo, haciéndolo más susceptible a la acción de las bacterias que precisamente se encuentran muy cómodas con ese cambio de pH. Por otro lado, la cal viva es óxido de calcio (CaO), que al absorber el agua de los tejidos reacciona a hidróxido de calcio Ca(OH)_2 , que a su vez en contacto con el aire reacciona a carbonato de calcio CaCO_3 , que al disolverse en agua se disocia en el ion carbonato CO_3^{2-} y en el ion Ca^{2+} , que está descrito como un inhibidor de la PCR [19]. No obstante, esto ya se contempla en el protocolo de extracción de polvo de hueso, que veremos posteriormente.

Sin embargo, el efecto de la cal viva en los cadáveres está poco estudiado, y todavía menos se sabe de cómo afecta verdaderamente la cal viva al análisis de ADN de los restos en función del intervalo de tiempo en el que se ha visto el material genético expuesto a esta sustancia.

4.3. Inmersión en ácido

En los últimos años está resultando un problema para la Procuraduría General de la República de México la ocultación de cadáveres disueltos en ácidos fuertes, tanto es así que a un único individuo, apodado *El Pozolero* (el pozole es un plato tradicional mexicano de origen maya que en sus inicios se elaboraba con carne humana, hoy en día de cerdo) se le atribuyen alrededor de 650 cadáveres disueltos en ácido, víctimas del crimen organizado [20].

En un experimento del Metropolitan Police Forensic Science Laboratory se vio que un fémur tardaba 4 días en disolverse en ácido sulfúrico concentrado, y un pie amputado 4 horas, generando muchísimo calor, por lo que la energía liberada por el contacto con el agua con los tejidos parece ser el factor clave. Otros ácidos que se pueden comprar fácilmente y que pueden disolver cuerpos humanos son el ácido clorhídrico, el ácido nítrico, o incluso la lejía. Teóricamente es posible disolver completamente un cuerpo en ácidos fuertes sin dejar rastros macroscópicos, si bien los componentes grasos son más resistentes al ácido por ser hidrófobos, resistiendo también componentes extraños como los implantes dentales, y también se ha visto que la microscopía SEM/EDX permita observar fragmentos corporales microscópicos como huesos o recristalizaciones de hidroxapatita [21].

La pregunta que nos hacemos es si es posible recuperar ADN en estas condiciones. Un estudio realizado con 20 dientes sumergidos en ácido clorhídrico concentrado de los que se extraía el ADN a intervalos de una hora de baño en ácido mediante el protocolo de extracción de fenol/cloroformo y cuantificación en NanoDrop®. El estudio muestra una correlación entre la cantidad de ADN obtenido y el tiempo de inmersión en ácido, siendo la reducción dramática a partir de la quinta hora. La calidad del ADN se estimó también por la ratio de absorbancia, que se vio afectada a partir de la primera hora de inmersión, aumentando con el tiempo, probablemente por la depurinación del ADN que causan al mismo los ácidos inorgánicos [22].

No obstante, son nuevamente muy pocos los estudios disponibles sobre cómo afecta el ácido a los cadáveres, y menos todavía los que estudian cómo afecta esta forma de ocultación al análisis de ADN, por lo que habrá que esperar más investigaciones sobre este tema.

4.4. Incineración

La incineración de cadáveres es otro clásico de la ocultación de cuerpos. En España tuvimos un ejemplo hace no muchos años, en los que un padre drogó a sus dos hijos para a continuación incinerar los cuerpos en su jardín, quedando pequeños y escasos restos de los que no fue posible obtener ADN que identificara a las dos víctimas [23].

En condiciones óptimas de temperatura toma 20 minutos que se quemen los tejidos blandos y se queden los huesos expuestos a la acción del fuego. A partir de ese momento el hueso experimenta diversos cambios de color relacionados con la temperatura que alcanzan: del color amarillento del hueso fresco pasa a marrón a los 300°C, ennegreciéndose completamente a los 400°C debido a la carbonización de los componentes orgánicos del mismo, y a los 500°C se calcinan completamente estos componentes, pasando el hueso primero a gris, y finalmente a blanco. Como en este tipo de fuegos la temperatura alcanzada no es homogénea, podemos observar diferentes estados en un mismo esqueleto, pudiendo incluso ver el horizonte de calor, dependiendo de factores como la temperatura alcanzada, el tiempo de exposición, la proximidad de la fuente de calor, el oxígeno disponible, y el medio ambiente [24].

En el caso de que los restos hayan sido expuestos al fuego se prefiere recurrir al ADN que pueda estar contenido en la pulpa dental, dado que los molares están protegidos por más cantidad de tejido blanco, y a su vez la cámara pulpar está protegida por dentina y esmalte, más resistente que la matriz ósea de los huesos largos. El ADN se desnaturaliza más allá de los 95°C, pudiendo ocurrir todo tipo de cambios degradativos, por lo que el ADN resiste muy mal las temperaturas. Sin embargo, se ha visto que es posible obtener material genético de dientes sometidos a 400°C durante menos de 2 minutos, momento a partir del cual no es posible obtener productos de amplificación [25]. Tiempo y temperatura están correlacionados, de manera que a menor temperatura mayor es el tiempo de exposición para la pérdida de ADN, por ejemplo, a 300°C sube a 3 minutos [26].

Es por ello que conocer la temperatura alcanzada por una hoguera. El método habitual utilizado por los forenses expertos en fuego es ver los cambios que se han producido en los diferentes materiales expuestos al incendio, dando la temperatura del mismo el punto de fusión más alto de los diferentes materiales encontrados [27]. En las hogueras se pueden alcanzar hasta 840°C, más que suficiente para que afecte al ADN, si bien requiere más de una hora alcanzar esas temperaturas, como se vio en un experimento realizado con ramas de eucalipto [28].

4.5. Enterramiento en el mar y agua dulce

No son pocos los naufragios que ha habido a lo largo de la Historia, y tampoco son pocos los que se producen al año actualmente (no pensemos únicamente en embarcaciones, que también, sino en aviones, por ejemplo), por lo que es interesante estudiar también las situaciones en las que nos podemos encontrar restos óseos en el fondo del mar. A este respecto, recordando *Los crímenes de la calle Morgue* de Edgar Allan Poe, cabe señalar que un cadáver se hunde primero, para posteriormente reflotar por los gases generados por la descomposición, factor íntimamente dependiente de la temperatura del agua, de manera que, si estas son profundas, puede no reflotar jamás a la superficie [29].

Veamos primero qué sucede en masas de agua *salada*. Una vez más tenemos que recurrir a cuerpos de cerdos como símiles humanos para intentar dilucidar los procesos que pueden tener lugar. En un experimento se sumergieron cuerpos de cerdos en lo más profundo del mar de Salish, ubicado entre Vancouver y Seattle en Estados Unidos, a una profundidad de 300 m, grabando en todo momento con videocámaras y luces potentes. Inmediatamente acudieron todo tipo de animales marinos a alimentarse de los tejidos blandos, produciéndose la esqueletización completa en solamente 3 días. A partir de ese momento los huesos se fueron recubriendo de limo, coloreando los huesos de negro hacia los 20 días, que fue tornando a gris con el paso del tiempo [30].

Hablando ya de análisis de ADN, ha sido posible obtener ADN de restos sumergidos en el mar durante tres años, pero no así en restos óseos sumergidos en el Mar Mediterráneo durante 8 años procedentes de un accidente de avión por estar muy degradados [31].

La cosa parece ser diferente cuando los cuerpos están en **agua dulce**. En una revisión hecha de casos reportados por forenses de la Columbia Británica se vio que la esqueletización no se instauraba hasta pasados los 120 - 180 días, produciéndose más rápido en restos sumergidos en aguas en movimiento que los sumergidos en aguas estancadas, que junto con la temperatura parece jugar un papel fundamental en la descomposición de los cuerpos bajo el agua [29].

Con respecto al análisis de ADN en restos óseos sumergidos en agua dulce, un estudio realizado en restos hallado en una presa del Río Sena de París permitió observar 11 de los 14 marcadores analizados, además del sexo de los restos, empleando columnas de Silica de Qiagen, en unos restos de aproximadamente tres años de antigüedad [32].

Cabe preguntarse si es peor para la conservación del ADN en restos óseos el agua dulce o en agua *salada*. A esto respecto un estudio realizado en fragmentos de costillas humanas incubadas en aguas a diferentes concentraciones salinas (ajustadas en el propio laboratorio) sugiere que el agua *salada* tiene mayor poder de degradación sobre el material genético [33].

4.6. Enterramiento en fosas comunes

Se podría pensar *a priori* que las fosas comunes no presentan diferencia con respecto a los enterramientos individuales más allá del volumen de víctimas. Pese a que las técnicas empleadas son similares, sí que hay diferencias [34]:

- *Interés*. En este contexto entran en juego, a diferencia de en los enterramientos individuales, los derechos humanos.
- *Motivación*. Son dos los motivos por los que se excava una fosa común: motivos humanitarios, con la finalidad de recuperar, identificar y/o repatriar víctimas, o por motivos forenses, con la finalidad de obtener pruebas que fundamenten una posible sentencia condenatoria.
- *Recursos*. Se necesita contar con ayuda de arqueólogos, antropólogos, médicos forenses, genetistas, equipamiento, instalaciones, etc.
- *Descomposición*. Además de ser distinta, hay nuevos efectos tafonómicos, y más cuando estamos ante una fosa secundaria en la que se han transportado individuos enterrados inicialmente en otra fosa.
- *Nivel de detalle*. Una fosa común va a dificultar la resolución de preguntas concretas que son precisamente las que persiguen las autoridades con la intervención: data de la muerte, causa de la muerte, y la propia identificación se vuelven preguntas con una (o dos) vueltas de tuerca en complejidad.
- *Implicación de la comunidad*. Para la identificación de las víctimas es necesaria una mayor participación de la comunidad, en tanto que será necesario hacer un sondeo masivo a familiares de víctimas y, en su caso, tomar muestras de ADN a familiares de las víctimas lo más cercanos posibles.

4.6.1. Búsqueda de fosas comunes

La primera parte en el estudio de una fosa común es la **búsqueda** de la misma. Para ello hay diferentes métodos, dado que hoy día no se dispone de una única técnica infalible para la búsqueda de fosas, debiendo recurrir a la integración de todas las disponibles. En primer lugar, tenemos la *prospección geofísica*. Agrupa un conjunto de técnicas utilizadas en Geología o Hidrografía, de las cuales la más conocida y probablemente la más utilizada sea el GPR (*Ground Penetrating Radar*, radar de penetración en el suelo). La técnica de *GPR* consiste en un aparato portátil dispara ondas electromagnéticas al suelo, midiendo la velocidad y la energía con la que vuelven, de manera que los diferentes materiales provocarán que las ondas vuelvan a velocidades y energías distintas, lo que permite crear una imagen de los diferentes materiales presentes en el suelo. Tiene la desventaja de que no funciona bien en suelos con materiales con propiedades absorbentes, ni en grandes superficies, pero está muy estudiado y ya se ha utilizado en nuestro medio con éxito

[35], y sus limitaciones están intentando suplirse mediante su combinación con otras técnicas como la utilización de drones para generar un mapa 3D de la superficie del suelo [36].

El problema es que muchos de los estudios realizados con técnicas de prospección geofísica se realizan en terrenos que son llanos, mientras que son muy pocos los realizados en zonas montañosas como es la nuestra. Es por ello que conviene tener en cuenta técnicas complementarias. Una variante de esta técnica es la *GPR de baja frecuencia*, que ha sido descrita con éxito para la localización de fosas de animales enterrados clandestinamente después de ser quemados [37]. En un terreno llano de gran extensión y con una geografía muy alterada por el depósito de limo, se utilizó primerio una antena de 50 MHz para detectar anomalías que luego fueron afinadas con la utilización de una antena de 100 MHz.

Otra técnica de prospección geofísica de aplicabilidad prometedora es la *resistivimetría*. La imagen por resistivimetría eléctrica (ERI) se forma por la medición de las diferencias de resistencia del suelo al aplicar en el mismo una corriente eléctrica. Esta técnica presenta como desventaja que es más laboriosa que el GPR y susceptible a mezclas en los estratos del terreno, pero tiene un mayor poder de penetración que el GPR, de unos 50 m, y ha sido aplicada con éxito en la localización de fosas comunes en Bosnia [38], en un terreno arbolado y con elevaciones.

Y la última herramienta que se suele utilizar a es la *magnetometría*, que consiste en la medición en el suelo de diferencias en el magnetismo provocadas por la presencia de objetos ferrosos, como son los objetos metálicos enterrados en el suelo, ya sean, por ejemplo, del ajuar con el que fueron sepultadas las víctimas, o las propias herramientas con las que fueron ejecutadas o fue excavada la fosa. Esta técnica se ha utilizado con éxito en combinación con el GPRS en la detección de fosas comunes en terrenos llanos y amplios [39], pero tiene la desventaja de que cualquier enterramiento de objetos ferrosos (contenedores, restos de vehículos, depósitos minerales, etc.) provocará falsos positivos con esta técnica.

Como técnicas complementarias a las anteriores puede recurrirse a los perros de búsqueda o a la excavación mecánica [34]. El excelente olfato de los *perros de búsqueda* es bien conocido; un entrenamiento mediante condicionamiento en el que asocian desde cachorros determinados olores como drogas, explosivos o los propios de la descomposición cadavérica; sin embargo, en el contexto de las fosas comunes tienen una utilidad relativa, pues los esqueletos no tienen un olor detectable [40]. Sin embargo, su uso no debe desdeñarse para la localización de puntos de interés en los que aplicar otros métodos de búsqueda. Finalmente, tenemos la *excavación mecánica*. Aunque pueda resultar chocante el uso de maquinaria pesada, vistas como rudas o poco sutiles en contraste con el detallado hacer de la ciencia forense, lo cierto es que resultan de gran utilidad cuando ningún método de búsqueda ha arrojado resultados, pero vecinos de la zona o familiares señalan zonas concretas en las que puede haber una fosa común. En contra de lo que pueden

parecer, la maquinaria de excavación puede hacer un trabajo muy sutil, levantando paulatinamente el terreno en horizontal, o realizando prospecciones en un tiempo mucho menor que con un equipo humano.

La búsqueda de fosas comunes es una parte de la investigación de las mismas que todavía tienen que ser perfeccionada. Sin embargo, la combinación de técnicas como las vistas y su afinación con la inteligencia obtenida de los testigos de la comunidad puede ser de gran ayuda para localizarlas.

4.6.2. Recogida de los restos

Una vez se hayan localizado los restos se procederá a su excavación con las diferentes técnicas arqueológicas disponibles. En toda investigación forense un paso muy importante es la interpretación *in situ* de los indicios, en relación a la propia escena y a los demás indicios. En el caso de las fosas comunes este paso nos la va a dar la *estratigrafía*, el estudio de las diferentes capas de tierra que se van depositando alrededor de los restos. Veamos, en primer lugar, las leyes de la estratigrafía [41]:

- 1) *Ley de superposición*. En una sucesión estratigráfica las capas inferiores son más antiguas que las superiores, que se forman por depósito de material o por remoción de las capas inferiores.
- 2) *Ley de la horizontalidad*. Los diferentes estratos se van depositando de forma horizontal, otras formas estarán causadas por un objeto que hizo que adoptaran esa forma.
- 3) *Ley de la continuidad*. Los diferentes estratos se depositan en capas diferenciadas, de otra manera el terreno ha sido excavado o se ha visto expuesto a la erosión.
- 4) *Ley de la sucesión estratigráfica*. Los estratos nuevos siempre van a depositarse sobre el más reciente, depositándose los siguientes sobre los anteriores, de forma que no siempre estará sobre uno más antiguo y bajo otro más reciente.

No obstante, las fosas comunes se forman como un evento único de deposición rápida. Una fosa es excavada, se colocan los cuerpos y se vuelve a llenar de tierra, y con el paso del tiempo una fosa puede ser alterada por acción humana, animal o del propio paisaje, creando secuencias estratigráficas más complejas. El *aspecto forense* más importante de una fosa es que congela en el tiempo las posiciones de los cuerpos durante el rellenado de la misma [42]. Pero también puede obtenerse información sobre la utilización de maquinaria pesada para excavar la fosa, la reapertura de la misma, o el tiempo en que fue excavada a juzgar por el polen y plantas hallados entre los cuerpos, e incluso pueden calcularse las trayectorias balísticas por los orificios de entrada en las paredes de la fosa y la detección de fragmentos óseos desprendidos del cráneo de las víctimas. La zona en la que se encuentran los cuerpos puede ser tratada como un estrato, y

habida cuenta de la gran cantidad de información que ofrecen estos, resulta obligatorio hacer un croquis de la disposición de los cuerpos en relación con los estratos.

Tafonomía es un término empleado en Arqueología para describir los cambios y, sobre todo, la rotura, que sufren los restos óseos después del enterramiento. Para el antropólogo es interesante estudiarlas para distinguirlas de, por ejemplo, una herida de arma blanca. Pero para el genetista es también diligente conocerlas, pues su presencia va a afectar a la integridad del hueso, y por ende, al futuro análisis de ADN que se pueda hacer. Algunos de los más importantes son [43]:

- a) *Meteorización*. Implica cambios en la superficie de los huesos por su exposición a la atmósfera, la tierra o la hidrosfera, comenzando con erosión de la superficie cortical hasta llegar a la fragmentación del hueso.
- b) *Plantas*. Las raíces buscan la médula ósea por estar repleta de nutriente, produciendo improntas en el hueso y fragmentándolo a medida que crecen alimentándose de la materia viva de este.
- c) *Animales*. Roedores y cánidos pueden tratar de alimentarse de los restos óseos, y mientras que los roedores roen (valga la redundancia) las epífisis de los huesos, los cánidos optan por molerlo para llegar a la médula ósea. Aunque no es frecuente, también pueden ser arañados por aves en busca de alimento. Y algunos insectos pueden alterar la superficie cortical.
- d) *Fractura*. A medida que pasa el tiempo los huesos van perdiendo su contenido en colágeno, lo que los hacía flexibles, de manera que son más frágiles, y por ende, susceptibles de ser fracturados incluso por el propio peso de la tierra o de otros huesos.

Al examinar los huesos al ojo desnudo y al microscopio (a 7x) se pueden identificar las características que permiten diferenciar una *buena* preservación de una *mala* preservación, lo que permite clasificar un hueso desde condiciones excelentes de conservación (similar a un hueso moderno) y condiciones pobres en una escala de Índice de Preservación Ósea (en inglés *Gross Preservation Index* o GPI) como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Índice de Preservación Ósea (GPI) [44]

GPI	Descripción
1 Preservación pobre	Superficie apagada y áspera La superficie se desmenuza, se descascara, y las capas internas del hueso quedan expuestas Los rotos y el hueso expuesto se desmenuzan, son quebradizos y poco definidos. El hueso parece ligero y hueco
2 Preservación aceptable	Superficie sin mucho brillo, textura áspera y granulosa Superficie con piscaduras o parches de <1 mm sin hueso Bordes rotos o hueso expuesto que se desmenuza

3 Preservación buena	Superficie brillante y lisa, pero con una textura ligeramente granulosa Superficie picada al microscopio, pero no más del 40% del campo de visión Rotos o superficie expuesta, pero que no se desmenuzan
4 Preservación excelente	Hueso límpido Superficie brillante, lisa, mantecosa y sin picaduras Hueso relativamente pesado y denso Los astillados y rotos son limpios

El último paso es la *recogida de material* y su remisión al laboratorio de ADN. El ADN antiguo o muy degradado, y aquí salta otra vez la importancia de la interdisciplinariedad en los equipos de trabajo, pues se pueden reducir drásticamente las contaminaciones del material, y sus correspondientes complicaciones analíticas, con unos pocos pasos que pueden hacer una gran diferencia [45]:

- 1) *Usar guantes desechables.* Protegeremos las muestras de contaminación con ADN exógeno si llevamos doble guante y cambiamos la primera capa entre muestras, al tocarnos la cara o el pelo, o al manejar ajuar encontrado en la fosa.
- 2) *No lavar las muestras con agua.* El agua contiene bacterias que pueden penetrar en el hueso y degradar todavía más el poco ADN que pueda quedar. Es suficiente con cepillar los huesos de forma superficial, cambiando de cepillo entre muestras o esterilizando los mismos.
- 3) *Almacenamiento en seco.* Hay que evitar a toda cosa que continúe la actividad bacteriana que degrada el ADN, por lo que los huesos deben almacenarse en un lugar fresco y seco.

Otras medidas opcionales y que ayudan a reducir la contaminación de las muestras para su análisis genético posterior son [45]:

- a) *Equipo de protección individual.* Si el presupuesto lo permite, llevar mono, calzas, guantes y mascarilla.
- b) *Proteger el lugar.* Salvaguardar la excavación y el material encontrado en la misma de la acción del polvo, la lluvia, o la luz solar directa, que dañarían el ADN.
- c) *Entrenamiento.* Educar a todo el personal participante en la excavación en nociones básicas de ADN antiguo y, sobre todo, en medidas para evitar la contaminación de las muestras con ADN exógeno.
- d) *Limpieza de las herramientas.* Si las herramientas utilizadas se limpian antes de utilizarlas, entre diferentes muestras óseas y después de utilizarlas con una solución de lejía al 10% se eliminaría el ADN que pueda quedar adherido a estas.
- e) *Registro.* Anotar el tipo de suelo, las condiciones de humedad, material biológico asociado, detalles que puedan observarse en la fosa y el personal que ha manejado las muestras pueden ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos.
- f) *Muestreo in situ.* Se hará de la siguiente manera:

- Si el esqueleto está articulado y su posición identificada, tomar primero la muestra para ADN antiguo antes de seguir con la excavación del mismo.
 - En el caso en que nos encontremos varios individuos mezclados separar los cráneos y tomar muestras de los dientes.
 - Si los restos están momificados tomar la muestra en el laboratorio.
- g) *Condiciones de almacenamiento.*
- Si los restos están congelados o en permafrost se deben congelar inmediatamente para que no se rompa la cadena del frío. Si no es posible, dejarlos atemperar envueltos en papel de filtro limpio para que no se forme humedad.
 - Guardar las muestras individualmente para evitar la contaminación cruzada, utilizando preferiblemente bolsas de papel, o de plástico si estamos seguros de que las muestras están totalmente libres de humedad.
 - Etiquetar bien cada bolsa individual con el tipo de muestra, lugar en el que se ha tomado, quién la ha tomado, fecha y hora, etc.
- h) *Contaminantes químicos.* Se debe evitar el uso de consolidantes, adhesivos y pegamentos, pues pueden introducir ADN exógeno o afectar a los análisis posteriores.

5. Obtención de ADN de restos óseos

Ya sabemos cómo son los huesos, qué métodos existen para localizarlos, cómo cabe esperar encontrarlos, y cuál es el marco normativo que rodea estas acciones. La pregunta ahora es: ¿qué hueso analizamos?

Cráneo, mandíbula y fémur son los huesos que más se encuentran en contextos de Antropología forense [46]. A medida que fueron realizándose análisis de ADN en restos óseos se iba viendo que había determinados huesos de los que se podía obtener un perfil decente, mientras que otros eran más problemáticos para el análisis. En uno de los primeros estudios se realizó el análisis del ADN mitocondrial de 1021 muestras de restos óseos de la Guerra de Vietnam (1955-1975), la Guerra de Corea (1950-1953) y la II Guerra Mundial (1939-1945) con el propósito de identificarlos comparándolos con muestras de referencia de familiares [47]. Se vio que el húmero, la tibia, el fémur, la costilla y los dientes eran los que más probabilidad tenían de obtenerse un perfil, si bien con respecto al número de muestras el húmero, la tibia, el fémur y los dientes están sobrerrepresentados con respecto a los otros restos esqueléticos, como se ve en la **Figura 7**.

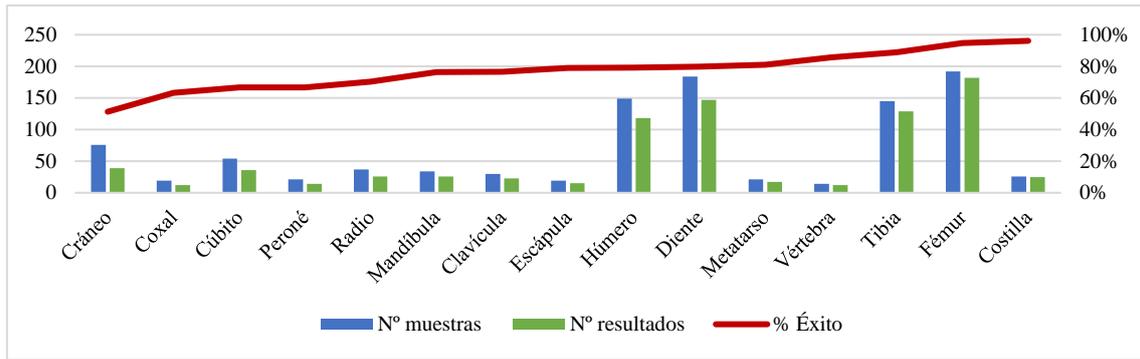


Figura 7. Porcentaje de éxito en el análisis de ADN mitocondrial en diferentes restos óseos procedentes de la II Guerra Mundial, la Guerra de Corea y la Guerra de Vietnam. Fuente: Elaboración propia a partir de Edson, Ross, Coble, Parsons y Barritt (2004).

Más detallado es el estudio de Miloš *et al.* (2007), en el que evalúan la obtención de un perfil de STRs en función del tipo de hueso en 24 656 muestras de diferentes restos óseos de tres conflictos bélicos distintos de la antigua Yugoslavia en los años 90: Bosnia y Herzegovina (1992), Srebrenica (1995) y Kosovo (1999) con el kit Promega PowerPlex 16 multiplex, considerando exitoso un perfil con 12 marcadores o más [48]. Como puede verse en la **Figura 8**, los huesos largos y los dientes vuelven a ser la muestra mayoritaria en los tres casos analizados, y que como cabe esperar, cuanto más antiguos son los restos son menos los resultados obtenidos, pese a que la diferencia es de unos pocos años. El propio estudio lamenta no disponer de indicadores ambientales con los que hacer comparativas entre los tres enterramientos.

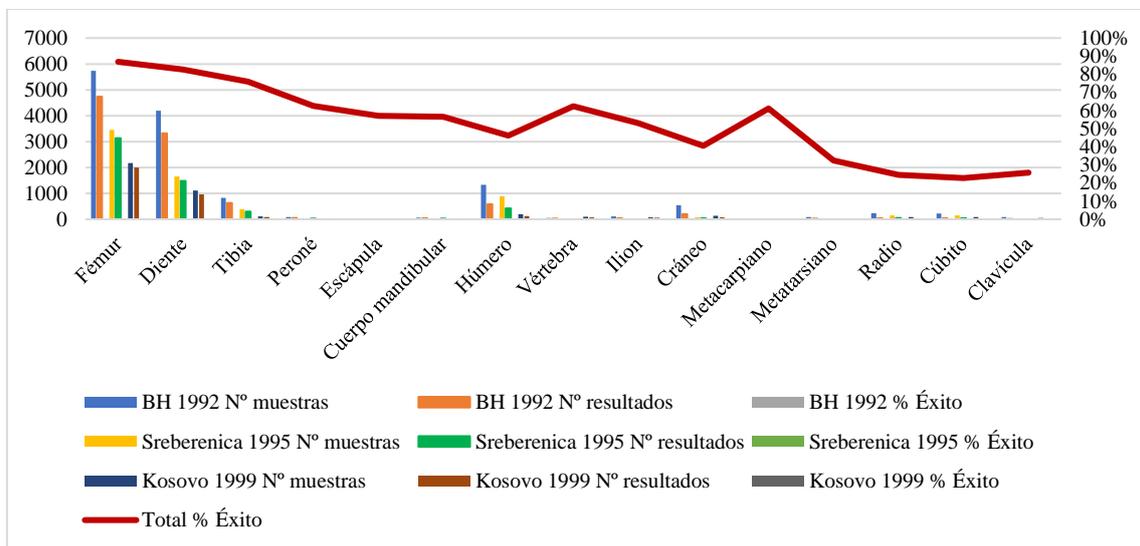


Figura 8. Número de muestras, número de resultados y porcentaje de éxito. Fuente: Elaboración propia a partir de Miloš *et al.* (2007).

Desde ese momento, la elección preferencial del fémur y los molares bien conservados fue Ley en los laboratorios de identificación genética que trabajaran con restos óseos. No obstante, en 2014 apareció en Nature una pequeña comunicación que, utilizando técnicas de secuenciación de alto rendimiento (high throughput sequencing) en restos óseos de diferentes épocas de la

Prehistoria, obteniendo un excelente rendimiento con el hueso petroso, comparado con coronas y raíces dentales (4-16 veces más), costillas y metacarpos (183 veces más) [49]. Estudios realizados con STRs muestran que los marcadores más pequeños amplifican en mayor cantidad, los marcadores más grandes tienen mayor probabilidad de amplificarse, y en general se obtiene más ADN que con las piezas dentales, debido presumiblemente a la cápsula protectora de hueso hipermineralizado con fibras de colágeno desorganizadas localizada alrededor de la cápsula ótica y que protege el material biológico incluido en la misma [50]. Así, los resultados de cuantificación con Quantifiler™ Trio muestran mucha más cantidad de ADN en hueso petroso que en fémur y dientes de las mismas muestras arqueológicas, obteniendo perfiles casi completos en las primeras mientras que los dientes daban como mucho cinco marcadores de NGM SElect™ [51]. Utilizando secuenciación de nueva generación con la plataforma de Illumina se han obtenido también resultados del 15 al 67% de rendimiento en restos óseos con diferentes grados de carbonización [52].

La clave del éxito del hueso petroso en la conservación del ADN reside en su estructura histológica. La región que envuelve la cavidad del oído interno (cóclea y canal semicircular) se compone de una matriz de colágeno tipo I, rico en células nucleadas, dentro de la cual se encuentran áreas de tejido cartilaginoso. Las fibras de colágeno se organizan de diferente manera: desorganizadas en la frontera del oído interno, y paralelas dentro del caparazón protector del oído. Además, la región desorganizada no presenta osteonas, lo que sugiere ausencia de vascularización. Esta estructura atípica, con hueso inmaduro menos vascularizado y remodelado que la pulpa dental (**Figura 9**), parece ser la clave que mantiene una gran proporción de ADN endógeno en la muestra [50].

Sin embargo, el entusiasmo por el descubrimiento del potencial del hueso petroso para estudios de ADN en muestras complejas ha dejado de lado la resolución de diversos problemas que se pueden plantear [53]: primero, la pérdida del hueso petroso al ser destruido por el análisis de ADN, dejando fuera de juego estudios osteológicos posteriores o análisis de otro tipo como los radioisótopos, una cuestión por la que antropólogos y arqueólogos y genetistas han discutido siempre; y una segunda cuestión es que los cráneos suelen tener un tratamiento diferente a la hora de ser enterrados, sobre todo en especímenes arqueológicos, por lo que puede resultar difícil vincular un cráneo con su esqueleto. Como solución conciliadora entre la preservación de los restos óseos y su íntimo análisis se ha señalado la utilización de los huesos del oído: martillo, yunque y estribo, que parecen ofrecer buenos resultados con secuenciación de alto rendimiento en muestras arqueológicas [54]. A estas consideraciones se le unen la necesidad de un estudio robusto de validación del hueso petroso como muestra forense, para lo que será necesario un estudio con una muestra amplia que compare nuevamente el rendimiento de las diferentes piezas de restos óseos entre sí.

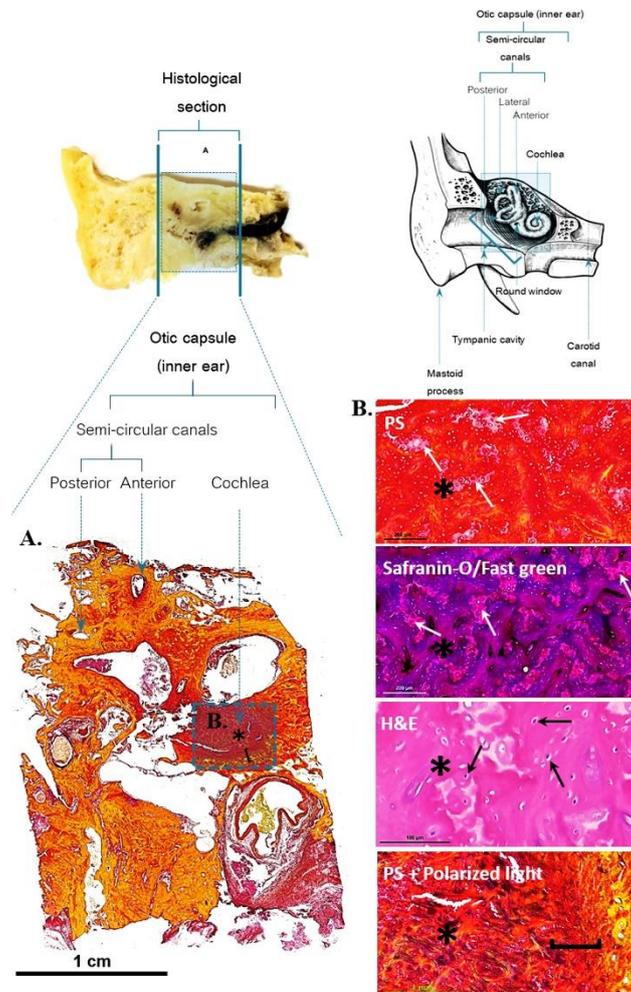


Figura 9. Histología del hueso petroso [50].

A. Sección histológica que incluye la cápsula ótica (cuadrado) y una estructura ósea peculiar (asterisco). B. Esta estructura peculiar teñida con picrosirius (PS) muestra áreas sin colorear (flechas blancas). Una tinción con safranina muestra la presencia de tejido cartilaginoso al mismo nivel, lo que con más aumentos con una tinción de hematoxilina y eosina muestra la presencia de núcleos (flechas negras). La tinción de picrosirius bajo luz polarizada muestra la presencia de fibras colágenas desorganizadas, mientras que las fibras que constituyen la cápsula protectora son paralelas (corchete).

Finalmente, la *International Commission on Missing Persons* ha elaborado un procedimiento para la elección de la muestra en función de qué elementos óseos se encuentran disponibles y, dentro de ellos, aquellos que se encuentren en mejor estado de conservación, estableciéndose un orden de prioridad de 1 a 6 (véase la **Figura 10**).

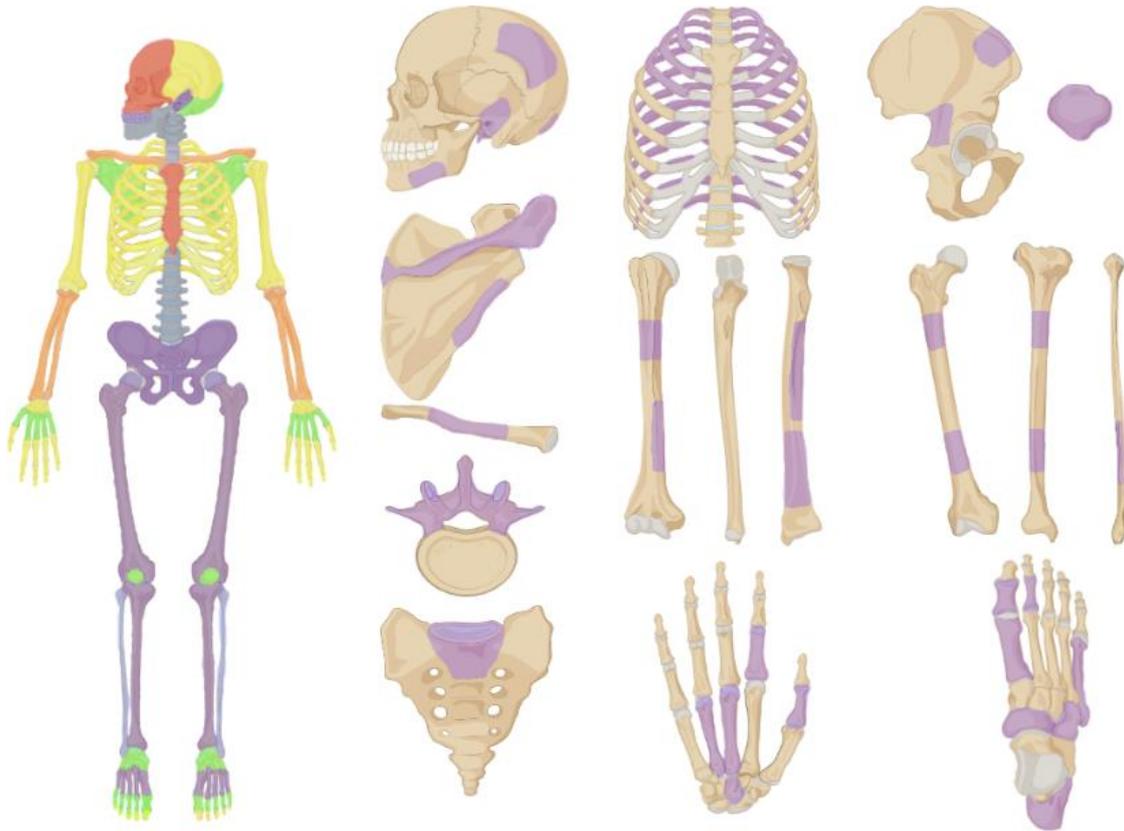


Figura 10. Orden de prioridad de morado (alta) a rojo (baja) para toma de muestra de restos óseos y región anatómica a muestrear [55]

6. Condiciones ambientales que influyen en la conservación del ADN en el hueso

El proceso exacto por el que ocurre la degradación de los huesos es desconocido; sin embargo, son tres los mecanismos que intervienen en la misma [56]:

- 1) *Química*. Las reacciones de glicación del colágeno hacen que el hueso sea más frágil y poroso a medida que se va perdiendo el colágeno, aunque la mayoría de las veces el hueso conservará sus canales originales. La pérdida de colágeno depende de la temperatura, el pH y el tiempo: altas temperaturas aceleran la deproteinización, valores extremos de pH aumentan la pérdida de colágeno y aceleran la hidrólisis.
- 2) *Mineral*. Aquí entran en juego las leyes de la termodinámica y el equilibrio de disolución y precipitación. Ya sea por la lluvia o por estar bajo el nivel freático, el contenido mineral de los huesos va a tender al equilibrio con el exterior, proceso favorecido por la presencia de agua, lo que dejará los huesos desprotegidos y más susceptibles a la desintegración química y biodegradativa.
- 3) *Biodegradativa*. La actividad microbiana es la principal, y su actuación es óptima en condiciones de pH neutro, y la degradación de la matriz ósea facilita la actuación de las enzimas microbianas, que de hecho no atacan el hueso de manera uniforme, sino que al microscopio pueden apreciarse pequeñas zonas de ataque.

Al igual que con el colágeno, la degradación del ADN ocurre con la reducción en la longitud de la cadena [56]. En primer lugar, ocurre la depurinación, acelerada a su vez por la glicación de las bases nitrogenadas, lo que desestabiliza el enlace fosfodiéster del ADN. Sin embargo, es diferente la degradación en ADN empaquetado, como es el nuclear, a la que ocurre en el ADN mitocondrial, que está libre. Con respecto a las condiciones ambientales, pocos cambios de temperatura y un pH estable parecen estabilizar la hidroxiapatita, y se ha conseguido amplificar ADN con 20 000 años en permafrost. Como método de orientación y para ver la importancia de la degradación de las moléculas del hueso, Poinar *et al.* en un estudio para medir la presencia de ADN endógeno en huesos antiguos a partir de la racemización del ácido aspártico, alanina y leucina, vieron que la ratio entre formas D y L del ácido aspártico permitía predecir si se obtendrían resultados de ADN o no [57]. Otro método emplea la cromatografía de pirólisis de gases y espectrometría de masas (Pyro-GC/MS) para medir la presencia de marcadores proteicos y de ADN, también con el objetivo de hacer un *screening* de presencia de ADN en las muestras, y parece que hay una correlación entre la preservación del ADN y la del colágeno [58].

Hay un factor que va a ser transversal a todos los que analizaremos a continuación, y es el tiempo: se ha visto que hay pérdidas fuertes de la cantidad de ADN analizable en restos óseos antiguos enterrados a partir de 8 meses desde el enterramiento [11].

6.1. Temperatura

Siendo la incineración del cuerpo del delito una técnica habitual del *modus operandi* criminal orientada a reducir la probabilidad de ser perseguido, es posible ver ampliamente en la literatura el estudio de la relación entre la integridad del indicio forense y la temperatura a la que está sometido. Es así como desde hace años se estableció como imposible la obtención de ADN mitocondrial de restos óseos sometidos a 800-1200°C de temperatura, quedando únicamente la recomendación de evitar la extracción de ADN de restos óseos carbonizados y buscar piezas dentales o tejido protegido por la ropa [59]. Un estudio más reciente fija la frontera en los 200°C [60], si bien hay diferencias en la obtención de un perfil en función de los marcadores utilizados o del protocolo de extracción; un problema para el que las plataformas de secuenciación de nueva generación parecen ofrecer una solución moderada [52]. Las dificultades analíticas vienen dadas por la desnaturalización, hidrólisis y depirimidinación sufridas por el ADN a los 80-90°C de temperatura [61].

Un estudio realizado sobre ADN mitocondrial y ADN nuclear en dientes antiguos encontró que una diferencia de hasta 2°C entre dos fosas suponía una gran diferencia (con el aumento de temperatura) en el estado de degradación del ADN [11].

Cuestión a parte de la temperatura, más relacionada con el Astro Rey, es la luz ultravioleta (UV), radiación electromagnética no visible cuya longitud de onda varía entre 10 y 400 nm. Si

bien en el contexto forense la luz de Wood forma parte del maletín de cualquier experto dedicado a la investigación de la escena del crimen, y su presencia en el Laboratorio de ADN está asegurada si es parte de la rutina el análisis de posibles indicios biológicos, es sabido que la luz ultravioleta es capaz de dañar el ADN. La luz UV se divide en tres longitudes de onda: UVA (320-420 nm), UVB (280-320 nm) y UVC (200-280 nm), siendo estas dos últimas las más absorbidas por el ADN, lo que provoca diversos fenómenos como la dimerización y la formación de diferentes fotoproductos que tienen en común la fragmentación del ADN, lo que a su vez ha resultado muy útil para eliminarlo de las superficies del laboratorio [62].

La luz solar terrestre se compone de un 62,7% de luz visible, un 31,9% de luz infrarroja, un 5,1% de luz UVA y un 0,3% de luz UVB [63], siendo la luz UVC absorbida por la atmósfera [64]. Un estudio sometió manchas de sangre, células suspendidas en agua y ADN libre en agua a la cantidad de rayos UVA y UVB normales de una tarde de julio en Washington (aproximadamente 32°C de media), observándose únicamente *drop-out* de los alelos con exposiciones a radiación UVB; de lo que se deduce que la exposición a la radiación ultravioleta solar, por sí sola, no explica la degradación del ADN [65]. Un estudio similar realizado con luz UVC da al ADN contenido en células hasta 35 años para que empiecen a notarse en el perfil los efectos degradativos de la radiación ultravioleta [66].

En Andalucía encontramos un clima marcadamente mediterráneo debido fundamentalmente a su localización geográfica, modulado por los siguientes factores [67]:

- *Geográficos*. El relieve y la altimetría modulan la temperatura con variaciones de 0,33-0,46°C/100 m, de manera que encontramos en las altitudes las temperaturas más frescas en verano y las más frías en invierno. Así, las cadenas Béticas dividen el clima andaluz en noroccidental y suroriental, estableciendo a su vez el Atlántico y el Mediterráneo un gradiente de la costa al interior.
- *Factores termodinámicos*. El verano andaluz está marcado por las altas presiones subtropicales que le dan estabilidad, ocasionando que se lleguen a sobrepasar los 40°C en el interior de la región. En cambio, en invierno encontramos tres tipos fundamentales de tiempo: estable y soleado por el aire tropical o polar marítimo, un tiempo seco y caluroso en Andalucía oriental y húmedo en Andalucía occidental, y la influencia repentina de depresiones frías.

Este conjunto de circunstancias hace que Andalucía reciba una media anual de 2600-2800 horas de sol, con una radiación solar que supera los 5 Kw/h/m² [68]. Con respecto a la temperatura, podemos establecer cinco zonas diferentes con sus propios rangos como se muestra en la **Figura 11** [69]:

- 1) *Clima costero*. Clima templado y húmedo con temperaturas medias anuales de 15-19°C, con temperaturas máximas de 23,5-25°C y mínimas de 10-17,5°C, y precipitaciones de 600 a 1000 mm.
- 2) *Clima del sudeste*. Esta región se caracteriza por un régimen térmico muy contrastado de 11-19°C de temperatura media y 240-250 mm de precipitaciones. Esta zona presenta 22-24,8°C como temperaturas máximas, si bien en verano han podido registrarse los 50°C, con 5-10,6°C como temperaturas mínimas.
- 3) *Clima de interior*. Clima templado y seco con temperaturas medias de 14-19°C, las máximas son de 25,5°C de media, sin embargo, es frecuente sobrepasar los 40-45°C en verano, en contraste con unas temperaturas mínimas de 9,8-12,3°C y 400-800 mm de precipitaciones.
- 4) *Clima de media montaña*. Clima templado-frío con 11-18°C de temperatura media anual y 600-1200 mm de valores pluviométricos medios anuales. Las temperaturas máximas oscilan entre los 22 y los 25°C, si bien es frecuente alcanzar los 40°C en verano, mientras que como temperaturas mínimas encontramos 4,8-8,9°C.
- 5) *Clima de alta montaña*. Clima frío con temperatura media anual de 2-13°C y hasta 1100 mm de valor pluviométrico. Como temperaturas máximas encontramos un rango de 10,5 a 14,0°C, siendo el rango de temperaturas mínimas de -1,6 a 1,6°C.

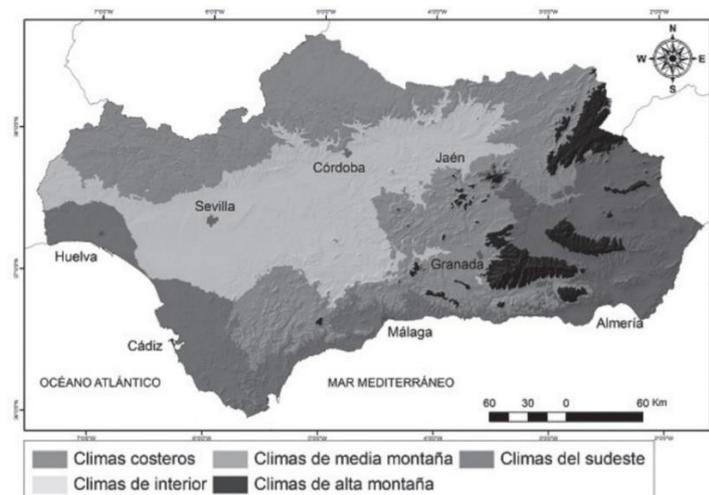


Figura 11. Zonas climáticas de Andalucía elaboradas por Gómez-Zotano, Alcántara-Manzanares, Olmedo-Cobo y Martínez-Ibarra [69].

La temperatura del suelo y la del aire circundante están íntimamente relacionadas, transmitiéndose al mismo mediante mecanismos de conducción molecular, convección térmica, radiación y evaporación-condensación del agua; de esta manera el factor que más va a modular la temperatura del suelo es la cantidad de agua presente en el mismo, que al aumentar el contacto entre sus diferentes componentes, al tiempo que los suelos húmedos serán más fríos a la salida del invierno durante más tiempo [70].

La cuestión de la temperatura en Andalucía va a ser el primer problema para la conservación del ADN en muestras de restos óseos antiguos, puesto que la degradación de todo material biológico depende de reacciones químicas como la autólisis cuyo pico de actividad se halla entre los 34 y los 40°C, aumentando la actividad de las mismas por el incremento de 10°C en la temperatura, al tiempo que temperaturas más cálidas favorecen el crecimiento de microorganismos que degradan las muestras biológicas; temperaturas más frías favorecerían la conservación del ADN [71]. El sometimiento de muestras biológicas a 50°C o 100°C durante 20 minutos no mostró diferencias significativas en su amplificación con el kit Identifiler [72], por lo que todo apunta es que la exposición continuada en el tiempo a altas temperaturas lo que degrada el ADN. De hecho, se ha visto que el ADN se degradada totalmente cuando muestras de sangre o saliva son sometidas a 55°C durante 13 y 17 días respectivamente [73]. Tanto es así que el índice de degradación del ADN mitocondrial a 25°C es de $4,5 \times 10^{-5}$ bases al año, siendo de $1,5 \times 10^{-7}$ a -5°C [74]. Por tanto, la zona climática en la que se hallen los restos va a hacer depender mucho el éxito en el análisis, siendo los restos localizados en los lugares en los que mayor temperatura se alcance los que ofrecerán, *a priori*, mayores dificultades para el análisis [75].

6.2. pH

Muchas de las reacciones químicas que intervienen en los sistemas biológicos son reacciones ácido-base en medio acuoso, por lo que resulta fundamental el estudio del pH, que no es más que el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno $[H^+]$ en un medio, utilizándose esta medida desde principios del siglo XX debido a que estas concentraciones se mueven en un rango de valores muy pequeño; son disoluciones neutras las que tienen un valor de $pH=7$ a 25°C, ácidas las que tengan un $pH < 7$, y básicas las que tengan un $pH > 7$ [76]. Los primeros efectos observados en el ADN bajo la adición de ácidos o bases fue la desnaturalización del mismo [77], y es que las bases púricas y pirimidínicas son relativamente insolubles en agua a pH neutro, mientras que un pH ácido o alcalino *aumenta* su solubilidad [78].

Valores de pH entre 5 y 9 no causan mayores problemas de conservación en los ácidos nucleicos, salvo que las bases estén modificadas, lo que alteraría la estabilidad de la doble hélice. Valores de pH inferiores a 5 (ácidos) o superiores a 9 (alcalinos) desestabilizan la doble hélice por afectación de los grupos polares de las bases, responsables de los puentes de hidrógeno que se establecen entre las mismas: las bases se ionizan y adquieren carga neta. *Valores bajos de pH* ($pH < 5$) disminuyen la solubilidad y pueden causar depurinación y rotura de la cadena, estabilizando nuevas conformaciones como triples hélices de pirimidina-purina-pirimidina. *Valores altos de pH* ($pH > 9$) tienen menores efectos y se usan frecuentemente para desnaturalizar ácidos nucleicos; no obstante, la depurinación y la rotura de la cadena puede, igualmente, producirse [79]. Es por ello que consideraremos los valores de pH menores a 5 como un factor de riesgo para la conservación del ADN.

El valor de pH de un suelo es tremendamente informativo, pues no solamente informa de la acidez o alcalinidad del mismo, sino también de la presencia de ácidos libres, de iones de aluminio, de hidróxido de aluminio, carbonato cálcico o carbonato sódico, viéndose afectado por la cantidad de agua (una mayor cantidad de agua diluirá el pH hacia el valor neutro), la cantidad de sales (tienden a bajar el nivel de pH), y el contenido en dióxido de carbono (al disolverse en agua forma ácido carbónico); el pH del suelo puede medirse tanto mediante colorimetría como mediante el uso de pH-metros [80]. En lo que se refiere a Andalucía, como se muestra en la **Figura 12**, el pH tiende a ser ácido hacia el Sur, neutro-básico en las zonas interiores, y ligeramente ácido en las zonas costeras [81]. Por lo tanto, en lo que a conservación del ADN y del material biológico se refiere, será la zona burdeos la que pondrá más dificultades para el análisis.

6.3. Humedad

Cuando hablamos de humedad del suelo nos referimos a su contenido en agua, es decir, al contenido másico o volumétrico de agua por masa o volumen de suelo respectivamente; la humedad del suelo puede determinarse por el método gravimétrico (pesando una cantidad de suelo y volviéndola a pesar después de ser sometida a 105°C), o por métodos indirectos como la atenuación de neutrones, la reflectometría de dominios magnéticos de tiempo, o la atenuación de rayos γ [70].

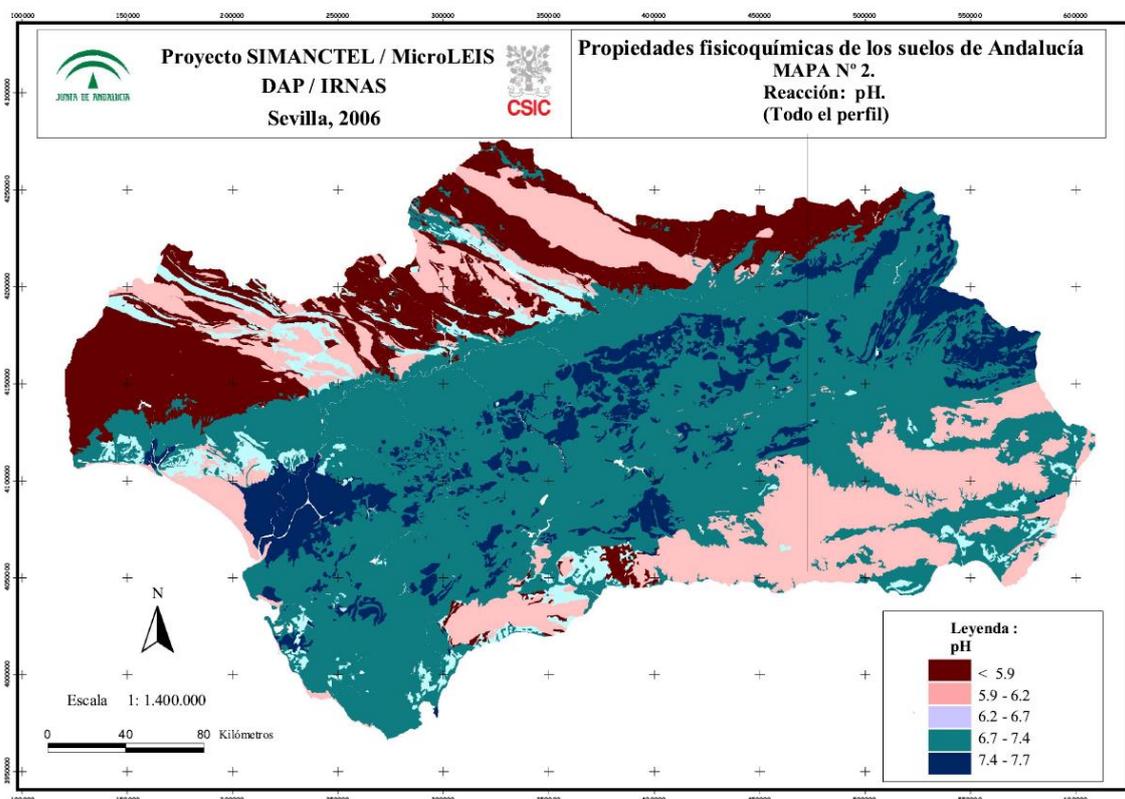


Figura 12. Mapa del pH del suelo de Andalucía [81]

El principal efecto que tiene la humedad en la conservación del ADN en los restos óseos viene dado por la porosidad de los mismos [75]: el agua puede penetrar fácilmente en el tejido óseo, lo que por un lado facilita las reacciones químicas degradativas antes vistas, y por otro introduce en el hueso sustancias que pueden tener actividad inhibidora. Niveles elevados de humedad no parecen afectar tanto a la cantidad de ADN como a la calidad de los perfiles que se pueden obtener, lo que sugiere que las posibles lesiones hidrolíticas producidas causarían tanto pérdida de ADN como una pérdida de alelos en los perfiles obtenidos [75].

Con respecto a la climatología andaluza, el contenido de agua del suelo vendrá dado por las precipitaciones y la humedad del aire propia del clima costero, de modo que según la clasificación vista anteriormente tendremos diferentes zonas climáticas con distintos grados de pluviosidad [69], lo que puede verse gráficamente en la **Figura 13**:

- 1) *Clima costero*. Presenta unos valores medios de 600-1000 mm, pudiendo registrarse máximos de 1500 mm/año y mínimos de 415 mm/año en la región más oriental; los máximos suelen registrarse a finales de otoño o invierno, viéndose atenuado el verano seco con la brisa, bruma y rocíos marítimos.
- 2) *Clima de interior*. En esta zona veremos 800 mm/año en barlovento y 400 mm/año a sotavento cuyos máximos se alcanzan en otoño-invierno, siendo el verano extremadamente seco.
- 3) *Clima de media montaña*. La media es de 600-1200 mm/año, con valores máximos en otoño-invierno y los mínimos en verano; los relieves sudoccidentales pueden alcanzar hasta 2000 mm, mientras que los más orientales tendrán en torno a 300 mm anuales.
- 4) *Clima de alta montaña*. El clima de alta montaña arroja máximos de 1100 mm a barlovento y 300 mm/año a sotavento, con un máximo desplazado hacia la primavera y una acusada xeracididad ambiental en verano por la insolación y la ausencia de precipitaciones; por supuesto, en las cumbres más altas encontraremos nieve que puede permanecer 8-12 meses.
- 5) *Clima del sudeste*. Los valores medios de pluviosidad son de 250-450 mm, 150mm en las zonas más secas y, excepcionalmente, 650 mm en las zonas montañosas, con una lluvia de tipo torrencial y máximos otoñales y mínimos en verano e invierno.

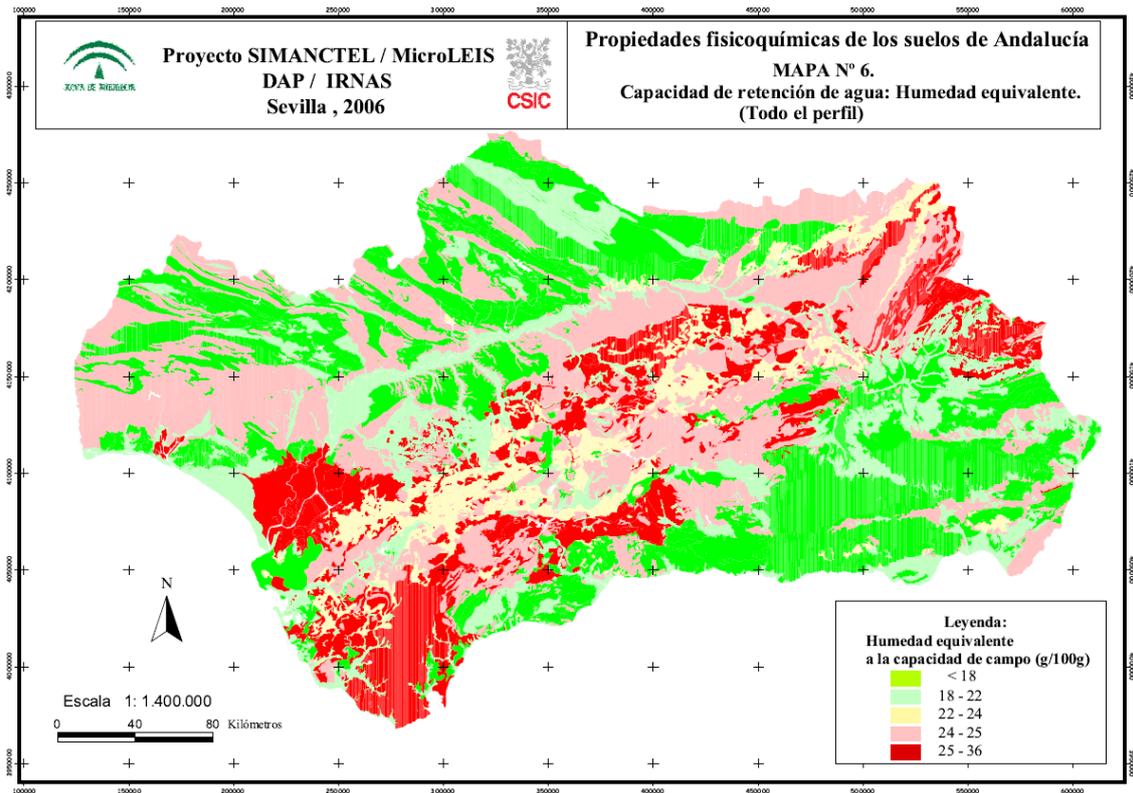


Figura 13. Humedad equivalente del suelo de Andalucía [81]

6.4. Componentes inorgánicos del suelo

Cuando hablamos de componentes inorgánicos del suelo nos referimos a la composición de las rocas a partir de las cuales se formó el mismo, pudiendo ser heredados, transformados o neoformados; formación que en definitiva estará supeditada al ciclo de las rocas: meteorización, sedimentación, metamorfismo, fusión, etc. [70]. Los distintos minerales que nos podemos encontrar en el suelo tienen un efecto desigual en la conservación del ADN. Así, un suelo con alto contenido en arena puede ayudar a preservar el ADN por su alto contenido en cuarzo, una sustancia con capacidad absorbente que puede secuestrar el ADN y protegerlo de agentes degradativos o inhibidores de la PCR [82]. Otro tanto puede decirse de las arcillas, por lo que la búsqueda de ADN antiguo en el suelo se muestra como un campo prometedor [83] habida cuenta de los últimos avances en secuenciación masiva, radicando la principal dificultad en distinguir el ADN exógeno del ADN de interés.

Otro componente interesante es la cantidad de oxígeno presente en el aire del suelo, que afecta tanto al crecimiento de vegetales como de microorganismos, y cuyo contenido variará desde el 21% atmosférico a porcentajes más bajos, en función de, entre otros factores, la porosidad del suelo [70]. Las moléculas de oxígeno participan en las lesiones oxidativas del ADN, tanto en la ruptura de cadenas como en la modificación de las bases nitrogenadas y distorsiones de la

hélice, al tiempo que, como se ha apuntado al principio, favorece la proliferación de microorganismos lo que aumentaría la degradación del material genético de interés [71].

Por lo tanto, vamos a considerar como factores protectores los suelos arcillosos y los arenosos. Los suelos con alto contenido en arcilla son escasos en Andalucía, siendo predominantes los que presentan un contenido en arcilla menor al 26%, alcanzándose máximos del 38-56% en regiones de Cádiz y Huelva (**Figura 14**). Las tierras con alto contenido en arena se disponen de forma inversa, encontrándose en mayores cantidades en el Sudeste y en el interior (**Figura 15**).

Ya vimos que un porcentaje importante de los restos hallados en fosas comunes presentan patrones de fusilamiento, por lo que cabe plantearse el posible efecto inhibitorio de los metales de los proyectiles, principalmente: plomo, cobre, zinc, níquel, y estaño. Plomo, cobre y níquel no muestran efectos inhibidores hasta 0,5 mM en cuantificaciones con Quantifiler™ Trio [84], al igual que el zinc y el cobre a 0,26 mM [85].

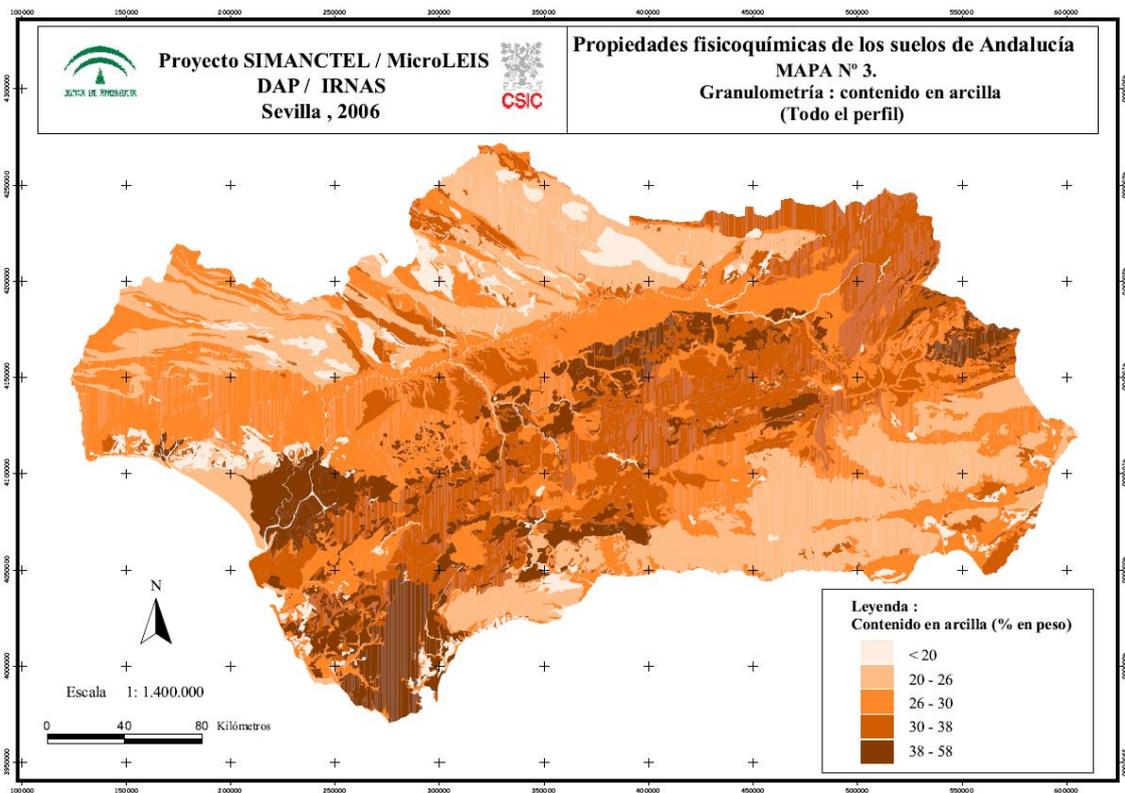


Figura 14. Contenido en arcilla del suelo de Andalucía [81]

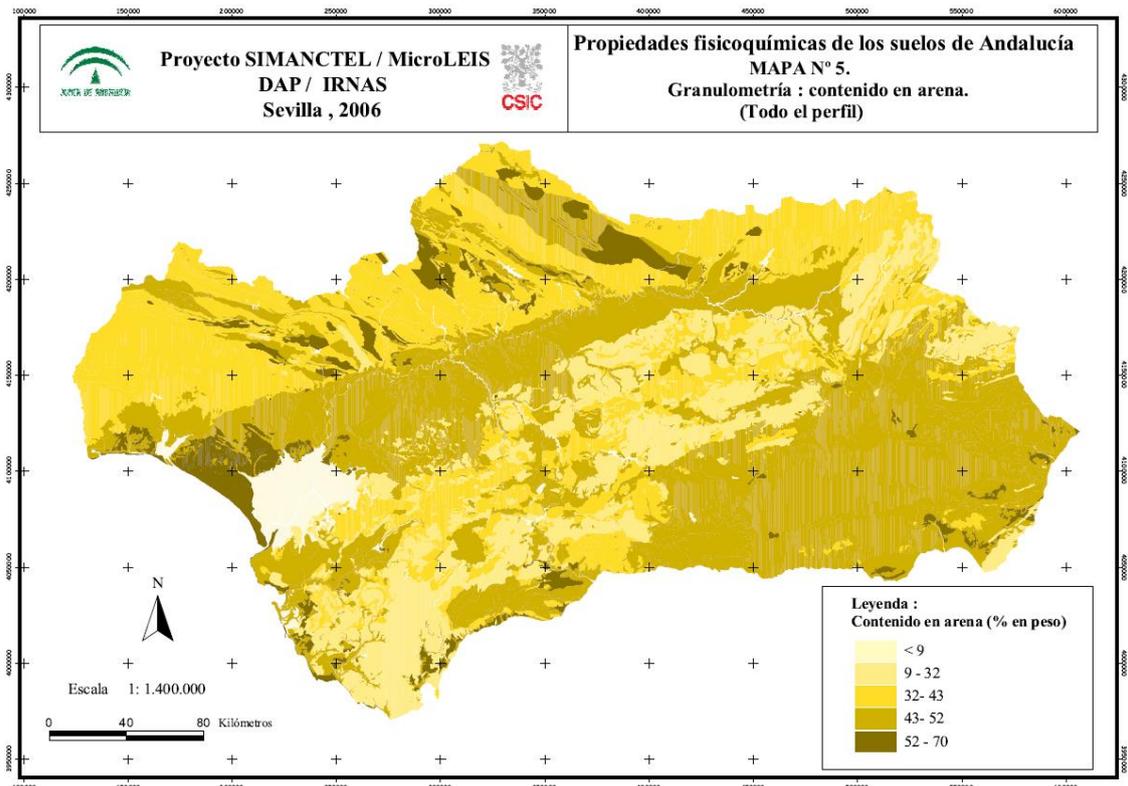


Figura 15. Contenido en arena del suelo de Andalucía [81]

6.5. Materia orgánica y microbiota

La presencia de materia orgánica (**Figura 16**) en los suelos se explica a partir de la aportación de biomasa muerta procedente de plantas, animales, microorganismos, y sus productos de alteración, viéndose su presencia favorecida por la vegetación, el clima, los organismos del suelo, la posición en una ladera, el drenaje, la textura del suelo, la composición de las arcillas, y el laboreo; se compone fundamentalmente de materia orgánica fresca o no humificada, integrada por biomasa muerta de plantas y microorganismos, y humus, sustancias producidas por la alteración de los productos sintetizados por plantas y microorganismos, compuesto a su vez por sustancias no húmicas y sustancias húmicas o humus en sentido estricto. Las sustancias húmicas comprenden el 60-80% del total de la materia orgánica del suelo, constituyen una mezcla compleja formada por procesos microbianos y abióticos de biomacromoléculas y sustancias de estructura no específica. El contenido en sustancias húmicas se determina actualmente mediante resonancia magnética nuclear y pirólisis [70].

Las sustancias húmicas se han clasificado tradicionalmente por su *color* y *solubilidad*: están las insolubles en medios alcalinos, las marrones y negras solubles en medio alcalino, y un tercer grupo soluble en agua. Como la variedad de componentes iniciales es tan grande (hidratos de carbono, celulosa, hemicelulosas, lignina, taninos, proteínas, lípidos y macromoléculas de lípidos [70]) y la posibilidad de combinaciones astronómicas, se dice que es imposible encontrar dos moléculas de sustancias húmicas iguales en un kilogramo de suelo [86]. Los ácidos húmicos,

ácidos débiles con grupos carboxilo e hidroxilo, son generalmente más grandes y pobres en grupos carboxilo que los ácidos fúlvicos, 100 000 Da frente a los 10 000 Da de las segundas [87].

La composición química del suelo puede complicar mucho los análisis de ADN en restos óseos. Huesos y dientes entran en equilibrio químico con el suelo que los rodea por lixiviación, proceso en el que los diferentes solutos del suelo se integran en el hueso, incluyendo sustancias que pueden degradar el hueso o modificar la estructura de hidroxiapatita, lo que finalmente repercute negativamente en la preservación del ADN [71]. La presencia de ácidos húmicos y fúlvicos puede afectar negativamente a la fase de amplificación de ADN debido a la actividad inhibidora de estas sustancias; además, la presencia de estas sustancias correlaciona positivamente con la humedad, la cual, a su vez, favorece la penetración de estos geopolímeros en el hueso, lo que puede acabar por traducirse, no tanto en pérdida de ADN, sino en modificaciones en su estructura que provocan inconsistencia en los resultados [75]. En cualquier caso, la actividad inhibidora de la *Taq* polimerasa de los ácidos húmicos es un mal conocido cuyo mecanismo de acción es la inhibición no competitiva (los geopolímeros se unen al complejo enzima-sustrato, dejándolo inactivo), observándose inhibiciones de ensayos de PCR a tiempo real con cantidades a partir de 4 mg/mL [88].

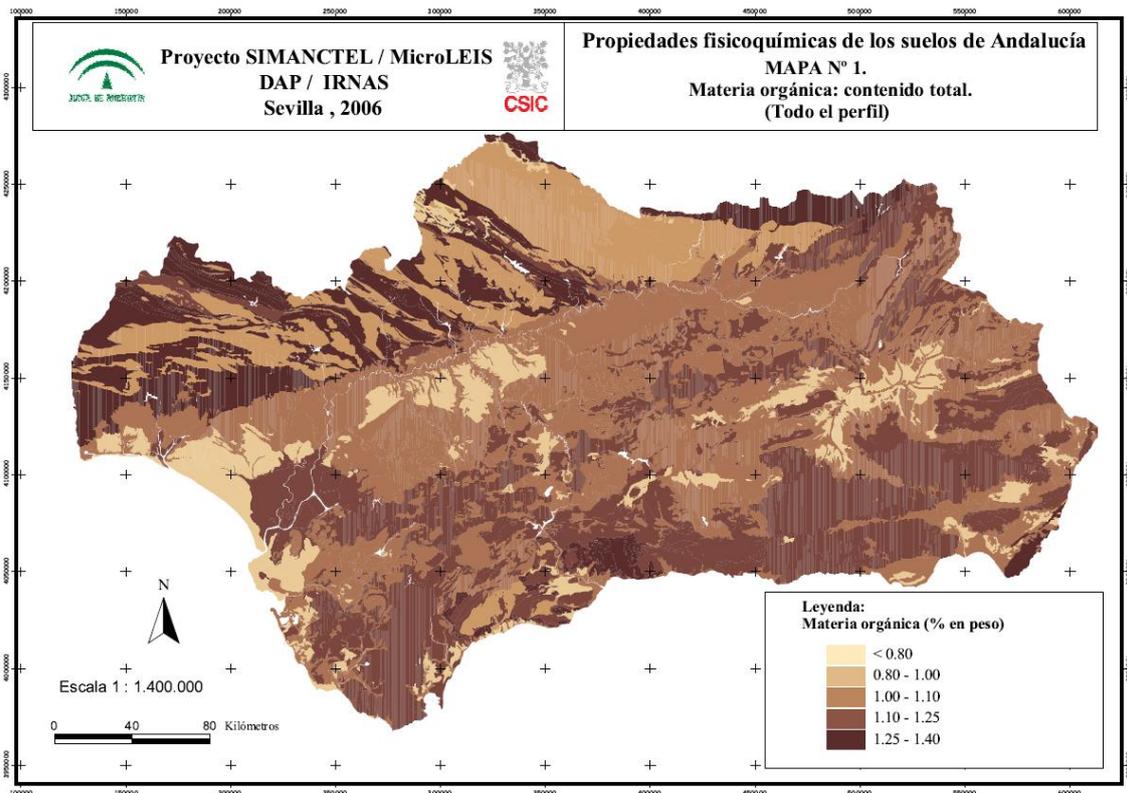


Figura 16. Contenido en materia orgánica en el suelo de Andalucía [81]

Potencialmente peligrosos para la preservación del ADN son también los microorganismos con actividad DNasa, grupo caracterizado por su capacidad de degradación del

ácido desoxirribonucleico, y que permite diferenciar *Serratia* spp. de *Enterobacter* Spp, *Staphylococcus aureus* de *Staphylococci* coagulasa-negativos, *Moraxella catarhallis* de *Neisseria* y otro patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp. y *Clostridium* spp.; la actividad DNasa se determina en una placa con agar semisintético con ácidos nucleicos en solución que se harán precipitar, no observándose precipitado en las colonias de microorganismos con actividad DNasa [89]. En los suelos de Andalucía se pueden detectar como bacterias antagonistas a las del género *Bacillus* (56,4%), *Pseudomonas* (27,7%) y *Paenibacillus* (7,4%), así como *Acinetobacter* sp. (3,2%), *Chryseobacterium vyrstaatense* (2,1%), *Rhodococcus wratislaviensis* (1,1%), y *Rahnella* sp. (1,1%) [90]. Por lo tanto, tendríamos un 84,1% de bacterias con posible actividad DNasa.

Inicialmente se creyó que los microorganismos eran los responsables del total de la pérdida del ADN endógeno de una muestra antigua, lo que no es compatible con el hecho de que muchas muestras presenten ADN en un estado aceptable habiendo estados sometidos a la misma actividad microbiológica, por lo que hay que tener en cuenta también otros factores como los ambientales [91]. Lo que sí parece ser clave es la degradación del colágeno y la hidroxapatita, que forman complejos con el ADN, protegiéndolo, por lo que la actividad bacteriana que degrade estas sustancias afectará negativamente a la conservación del ADN.

Otra cuestión a tener en cuenta es la proliferación de microorganismos en la descomposición del cadáver. A este respecto hay poca bibliografía, soliendo dejar la cuestión en que los microorganismos responsables de la descomposición del cuerpo serán los presentes en el ambiente y los propios de la flora bacteriana del fallecido. Estudios en cultivos contrastados con métodos moleculares sugieren que los anaerobios *Clostridium* y *Bifidobacterium* son las especies más abundantes, seguidos por los anaerobios facultativos como *Lactobacillus* y *Enterobacteriaceae*. Se piensa que las especies de *Clostridium* colaboran en la descomposición degradando lípidos e hidratos de carbono complejos asociados a los tejidos humanos produciendo ácidos orgánicos y alcoholes. *Pseudomonas* y *Bacillus* tienen capacidad reductora de sulfatos, estando asociadas a la degradación de proteínas [92].

Es posible caracterizar los microorganismos que han afectado por la forma que tienen de atacar el hueso, pudiendo dividir este ataque en tres grupos: lineal longitudinal, en forma de flor, o laminado, viéndose muy relacionada esta actividad microbiana con las variaciones estacionales en el contenido de agua del suelo. Además, las bacterias responsables de estas tunelaciones son aerobias, no dándose estos fenómenos tafonómicos en huesos enterrados en profundidad en un medio saturado de humedad, siendo, por tanto, otro factor clave el del oxígeno disponible [91].

En lo que respecta a la descomposición del hueso, la pérdida de proteínas o la pérdida parcial de mineral óseo desembocarán en un debilitamiento de la estructura ósea. Es frecuente

que los huesos que se recuperan de medios aerobios y no ácidos estén en buenas condiciones, mientras que en terrenos más húmedos y oxigenados con arenas calcáreas o margas los huesos tenderán a laminarse o romperse, al tiempo que el material óseo depositado en gravas calcáreas perderán mucho más colágeno, llegando a tener la consistencia de la tiza. En turba ácida los huesos llegan a una textura de fibras entrelazadas que se endurecen al secarse; de hecho, la presencia de ácidos en el suelo parece ser el agente destructor de hueso más común, pues disuelve la matriz inorgánica de hidroxiapatita en materia orgánica susceptible de ser disuelta en agua. El colágeno del hueso es atacado por las bacterias colagenasas con capacidad de hidrolizar proteínas para formar aminoácidos, resaltando aquí las bacterias *Clostridium histolyctium*, que tienen un rango óptimo de pH de crecimiento de 7 a 8. Otros sugieren que las colagenasas bacterianas degradan el colágeno en péptidos que se disuelven en el agua ambiental. En cualquier caso, una vez que la unión proteína-mineral se rompe es susceptible de disolución parcial, lo que explicaría que los huesos se preserven mejor por lo general en suelos con pH neutro o ligeramente alcalino. En este sentido los suelos arenosos favorecen la preservación del hueso al dificultar la proliferación bacteriana [93].

Las diferencias de microorganismos observados en los diferentes estudios se deben a la variabilidad individual en el microbioma, estacionalidad, el clima, y las especies entomológicas colonizadores; sin embargo, la abundancia de un determinado grupo no indica necesariamente diferencias significativas en la descomposición, lo cual sigue suponiendo, a día de hoy, un misterio [92].

Cabe preguntarse qué taxones pueden relacionarse con la preservación del ADN. En este sentido hay pocos estudios, pero el mejor modelo actualmente disponible combina datos de bacterias procarionas y eucarionas, siendo *Saccharomycetales*, asociada al microbioma oral en individuos sanos, el contribuyente al modelo más importante, que bajaba en importancia conforme aumenta la concentración de ADN en el cráneo. *Actinotalea* y *Paracoccus* en abundancia correlacionaban con ADN bien conservado en los dientes, y *Dermacoccaceae* a su vez en los pies. Por su parte las bacterias *Clostridium*, conocidos productores de colagenasa, se asocian con una disminución del ADN. Si estas se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal, los huesos más alejados de esta zona serán los que, *a priori*, mejor conserven el ADN [94].

Parece haber diferencias entre la microbiota que puede encontrarse en los huesos en función de si están enterrados más superficialmente o a mayor profundidad, especialmente en Planctomycetes, Chloroflexi, Chlamydiae y Deinococcus-Thermus, prevalentes en restos enterrados superficialmente. De hecho, parece ser que las comunidades microbianas que pueden encontrarse en el hueso son una combinación de las asociadas al suelo y al tracto intestinal, de

manera que los huesos más superficiales presentan una microbiota más similar a la del suelo, mientras que a mayor profundidad más se aproxima ésta a la del tracto intestinal. El estudio que llega a estas conclusiones también sugiere la relación entre *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae sin clasificar, *Azospira*, Burkholderiaceae sin clasificar, *Microvirgula*, *Caproiciproducens* y Clostridiaceae sin clasificar, y la degradación del ADN presente en la muestra, dada la actividad de solubilizar el fosfato orgánico e inorgánico inherente a las *Pseudomonas*, rompiendo el enlace entre la hidroxiapatita y el ADN [95].

Con todo, las Ciencias Forenses están cada vez más interesadas en el estudio de los microorganismos, gracias en parte a los últimos avances en secuenciación masiva, no sólo como herramienta de identificación humana mediante la caracterización del microbioma, que se postula como único entre individuos, sino que también puede aportar información sobre el estado de salud de un individuo, su dieta, su geolocalización a partir del microbioma reciente o de transición, el intervalo de tiempo *post mortem*, o el terrorismo biológico [96].

6.6. Edafología: una visión holística

En las diferentes etapas que componen el análisis de ADN podemos decir que hay diferentes momentos clave: el tipo de muestra (cantidad de ADN que presenta y estado de degradación del mismo, esto es, cantidad y calidad de ADN), el proceso de extracción (rendimiento, cantidad de ADN que puede extraerse purificado), y la amplificación, íntimamente ligada a las dos condiciones anteriores.

El presente capítulo ha tenido el objetivo de estudiar las diferentes condiciones ambientales que pueden afectar a la conservación del ADN: temperatura, pH, humedad, la presencia de determinados componentes orgánicos e inorgánicos, y la microbiota. Aunque parece ser que son pH y humedad los factores que más condicionan la preservación del ADN en la muestra, cómo se pondera cada factor y, sobre todo, cómo se interrelacionan sigue siendo desconocido a día de hoy. De hecho, aunque hemos visto que el ADN se degrada con cierto ritmo constante, el proceso de degradación llega a alcanzar cierto equilibrio en el que la destrucción o transformación de la secuencia de bases nitrogenadas se ralentiza e, incluso, se detiene [97]. Es por esto que el estudio de la muestra para análisis de ADN debe ser afrontado de una visión holística como es la dada por la Edafología, disciplina dedicada al estudio del suelo, que encuentra en las Ciencias Forenses múltiples aplicaciones, dada una de ellas por la Genética Forense.

El ejemplo más claro de la naturaleza holística de estos factores es la humedad. Un ambiente húmedo afecta a la descomposición, al tiempo que las moléculas de agua participan en la hidrólisis del ADN, y ya hemos visto que en los ambientes más húmedos el ADN que se puede extraer presenta mayor degradación, pero también es cierto que una turbera (humedales ácidos)

6. Condiciones ambientales que influyen en la conservación del ADN en el hueso

favorecen la preservación del ADN porque hay poco oxígeno disponible, lo que reduce la actividad microbiana [71].

7. Experimento #1. Comparativa del análisis de ADN en hueso petroso, diente, fémur y tibia de restos óseos degradados.

El objetivo de este experimento es evaluar la eficiencia en el análisis de ADN (utilizando datos de cuantificación y del perfil genético obtenido) del hueso petroso en comparación con otras muestras craneales (dientes) y poscraneales (fémur y tibia), analizándose un total de 88 muestras de 38 individuos diferentes. Este ensayo cuenta con una publicación en la revista *Electrophoresis*:

Haarkötter, C, Vinuesa-Espinosa, DC, Gálvez, X, Saiz, M, Medina-Lozano, MI, Lorente, JA, et al. A comparison between petrous bone and tooth, femur and tibia DNA analysis from degraded skeletal remains. *Electrophoresis*. 2023; 1–10. <https://doi.org/10.1002/elps.202300097>

7.1. Material y métodos

La preparación de la muestra, la extracción de ADN, la cuantificación y la amplificación se llevaron a cabo en un laboratorio de muestras mínimas siguiendo las recomendaciones internacionales para este tipo de muestras [98–100]. Las medidas de prevención de la contaminación incluyen radiación UV de la sala, presión positiva con filtro HEPA, limpieza de superficies con DNAZap™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) y el uso de material de laboratorio estéril. Las medidas de detección de la contaminación incluyen los índices de degradación estimados en la cuantificación, perfiles en forma de pendiente de esquí (*ski-slope*), y comparación de los perfiles obtenidos con los del personal del laboratorio.

Preparación de las muestras

Se analizaron un total de 88 muestras de restos humanos procedentes de fosas comunes de Andalucía: 11 tibias, 21 fémures, 22 dientes, y 34 huesos petroso, de un total de 38 individuos (véase la **Tabla 2**). El grado de preservación de las muestras comprendía desde restos ligeros, huecos y frágiles a restos ligeramente granulares [44]. La selección de las muestras se hizo con la premisa de tener los cuatro tipos de muestra de un mismo individuo, lo cual no fue siempre posible debido al estado de preservación de los restos.

Tabla 2. Muestras por individuo (I)

I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9
Petroso	Fémur Tibia	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Fémur Tibia
I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18
Fémur Tibia	Diente Fémur Tibia Petroso	Fémur Tibia Petroso	Fémur Tibia Diente Petroso	Fémur Tibia Diente	Fémur Tibia Petroso	Fémur Tibia Diente Petroso	Fémur Tibia Diente Petroso	Fémur Tibia Diente Petroso
I19	I20	I21	I22	I23	I24	I25	I26	I27
Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso	Diente Petroso

7. Experimento #1. Comparativa del análisis de ADN en hueso petroso, diente, fémur y tibia de restos óseos degradados.

I28	I29	I30	I31	I32	I33	I34	I35	I36
Diente Petroso	Fémur Petroso							
I37	I38							
Fémur Petroso	Fémur Petroso							

Las muestras se lijaron y cortaron en fragmentos de 0,5-1 cm con un minitaladro Dremel® [101], exponiéndose los fragmentos a luz UV en una cabina durante 10 minutos a cada lado [102], para finalmente pulverizarlas en un equipo TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Alemania), en dos ciclos de 30 Hz durante 30 segundos. Se transfirieron 1,0 gramos de pulverizado de hueso a tubos Falcon de 15 ml.

Extracción de ADN

Las muestras se extrajeron siguiendo un protocolo interno basado en el protocolo de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [103]. 5 ml de buffer de extracción (4125 µL de EDTA 0,5 M, 300 µl de SDS al 10%, 375 µl de proteinasa K a 10 mg/ml y 200 µl de DTT 1M) se añadieron a cada pulverizado de resto óseo, incubándose durante la noche a 56 °C. A continuación, el lisado se centrifugó 5 min a máximas revoluciones, transfiriéndose a un tubo Falcon de 15 ml limpio, añadiéndose 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). El sobrenadante se transfirió a una columna Amicon Ultra-4 de 30 kDa (Merck, KGaA) para su filtración, realizándose dos lavados con agua destilada ultrapura. Finalmente, los extractos se purificaron con las columnas de QIAquick con un volumen final de 75 µL [104].

Cuantificación de ADN

Los extractos de ADN se cuantificaron con el kit Quantifiler™ Trio (ThermoFisher), siguiendo las recomendaciones del fabricante [105], amplificando dos réplicas de cada muestra, cinco estándares y un control negativo en un equipo QuantStudio™ 5 (ThermoFisher). Se analizaron cuatro parámetros: media de la diana pequeña (80 pb), media de la diana grande (214 pb), media de la diana humana masculina (75 pb) y el índice de degradación (calculado como la ratio diana pequeña/diana grande).

Amplificación de ADN y visualización de resultados

Los extractos de ADN se amplificaron con GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (ThermoFisher) siguiendo las recomendaciones del fabricante [106]. 15 µL de cada extracto se añadieron a cada reacción para un volumen final de 25 µl. Los fragmentos se visualizaron en un equipo 3500 Applied Biosystems Genetic Analyzer con los parámetros recomendados. Los datos se analizaron con el software GeneMapper™ ID-X 1.6, estableciéndose un umbral analítico de 50 RFU y un umbral estocástico de 365 RFU (ambos determinados tras validación interna). Se tomaron cuatro

parámetros: 1) el número de alelos detectados (altura mayor a 50 RFU), 2) el número de alelos reportables (altura mayor a 365 RFU), 3) promedio de RFU, y 4) número de marcadores reportables (*loci* heterocigotos con picos con altura mayor a 50 RFU y un balance de heterocigosidad de al menos 0,6 o *loci* homocigotos con picos con altura mayor a 365 RFU). Se excluyeron los marcadores Yindel, DYS391 y amelogenina.

Los análisis estadísticos (media, prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, coeficiente de variación de cuartiles, CQV, y las pruebas no paramétricas ANOVA y de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner) se hicieron con jamovi 2.2.5 [107].

7.2. Resultados y discusión

Resultados de cuantificación

Los resultados de cuantificación se muestran en la **Tabla 3** (el promedio y el coeficiente de variación cuartílico, CQV, una medida robusta de la dispersión en datos no paramétricos). El hueso petroso alcanzó los valores más altos de cuantificación de la diana pequeña con 0,723 ng/μL en promedio, seguido por el diente (0,051 ng/μL), tibia (0,040 ng/μL), y fémur (0,022 ng/μL). La cantidad de ADN detectada en el hueso petroso fue bastante grande, con valores que van desde 0,009 ng/μL a 1,824 ng/μL. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de cuantificación (p-valor <0,001 con una confianza del 95%) en una comparación entre pares de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Tabla 3. Resultados de cuantificación (media y coeficiente de variación de cuartiles) por muestra.

	Fémur	Tibia	Diente	Petroso
Diana pequeña (ng/μL)	0,022	0,040	0,051	0,723
CQV	0,701	0,745	0,847	0,433
Diana grande (ng/μL)	0,004	0,010	0,009	0,031
CQV	0,831	0,634	0,879	0,858
Diana masculina (ng/μL)	0,023	0,028	0,047	0,560
CQV	0,651	0,464	0,896	0,562
Índice de degradación	7	10	12	81

En la **Figura 17** se muestran los diagramas de caja de cada diana por muestra. Si se agrupan las muestras por la diana pequeña, sólo el 6% de los huesos petroso analizados obtuvo menos de 50 pg de ADN (mínimo habitual de los kits comerciales de amplificación), mientras que el 90% de los fémures analizados tuvo menos de esa cantidad (82% en el caso de la tibia y 59% en el caso del diente), siendo el hueso petroso el único del que se extrajeron valores de 0,5-1 ng/ μL (41%) o más de 1 ng/μL (24%).

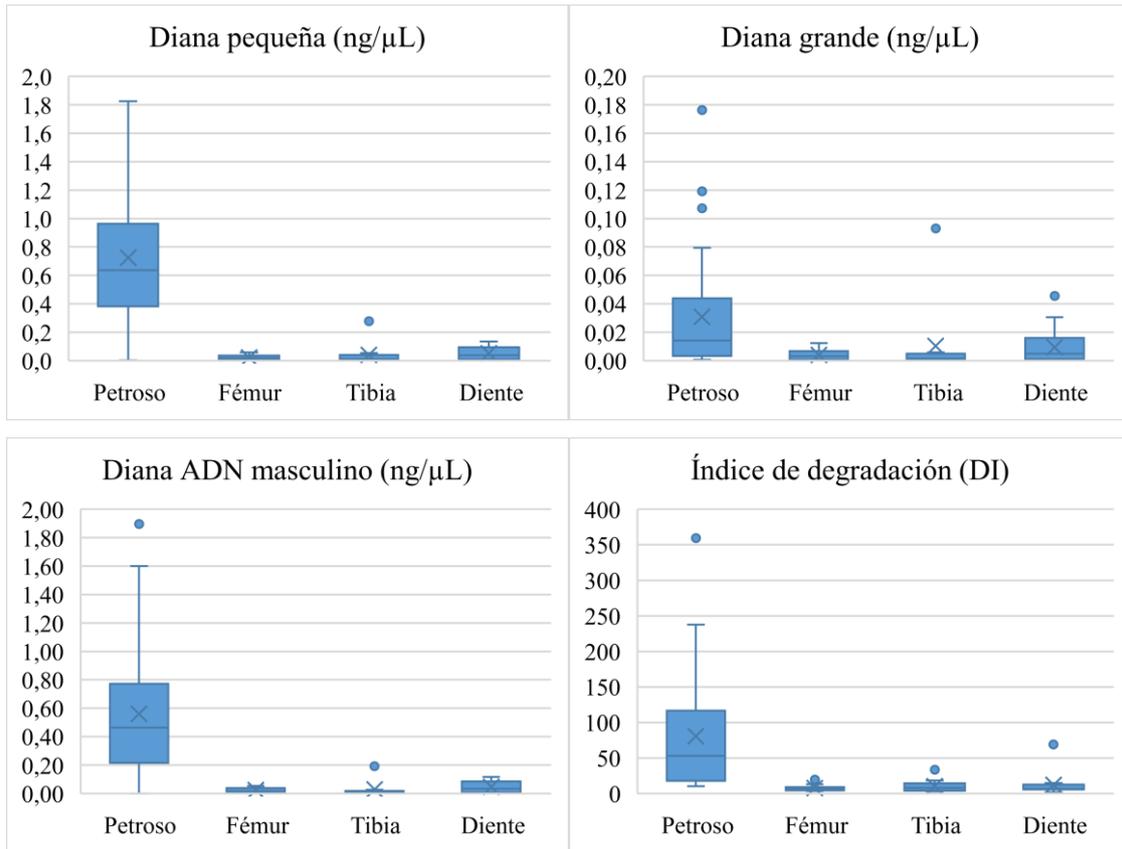


Figura 17. Diagramas de caja de los datos de cuantificación: diana pequeña, diana grande, diana masculina e índice de degradación por tipo de muestra.

El hueso petroso fue el único en fallar en la detección de la diana grande en una única ocasión, consiguiendo el valor más alto en promedio de ésta (0,031 ng/μL), seguido por tibia (0,010 ng/μL), diente (0,009 ng/μL), y fémur (0,004 ng/μL). Los valores máximos fueron alcanzados también por este hueso, cuyos resultados fueron desde 0.0006 hasta 0.176 ng/μL. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre fémur y petroso (p-valor=0,003), y tibia y petroso (p-valor=0,016).

El índice de degradación más alto fue observado en el hueso petroso, obteniendo 81 en promedio, seguido por diente (12), tibia (10), y fémur (7). En el hueso petroso en general se obtuvieron valores muy altos de degradación, de 10 a 200, lo que no quiere decir que su ADN se conserve peor que en el resto de las muestras, sino que, al recuperarse una cantidad de fragmentos pequeños de ADN mucho mayor, se obtuvieron valores de degradación más altos. Así, se observaron diferencias significativas entre este hueso y el resto de las muestras en este parámetro (p-valor<0,001).

En resumen, se obtienen valores de cuantificación más altos en el hueso petroso que en el resto de muestras, como se venía indicando en la literatura [108–110], obteniéndose de 15 a 30 veces más AND que con otras muestras.

En la **Figura 18** se muestran los valores obtenidos en la diana pequeña para cada muestra y por tipo de hueso, observándose claramente que, en un mismo individuo, el hueso petroso obtiene valores de cuantificación mucho más altos: aproximadamente 30 veces más ADN que en el caso del fémur, y 18 veces más ADN que en el diente en el mismo individuo, consiguiendo este último unas 10 veces más ADN que el fémur o la tibia. Los huesos largos obtuvieron aproximadamente los mismos valores, aunque en algunos individuos de la tibia se consiguió hasta 3 veces más ADN que del fémur.

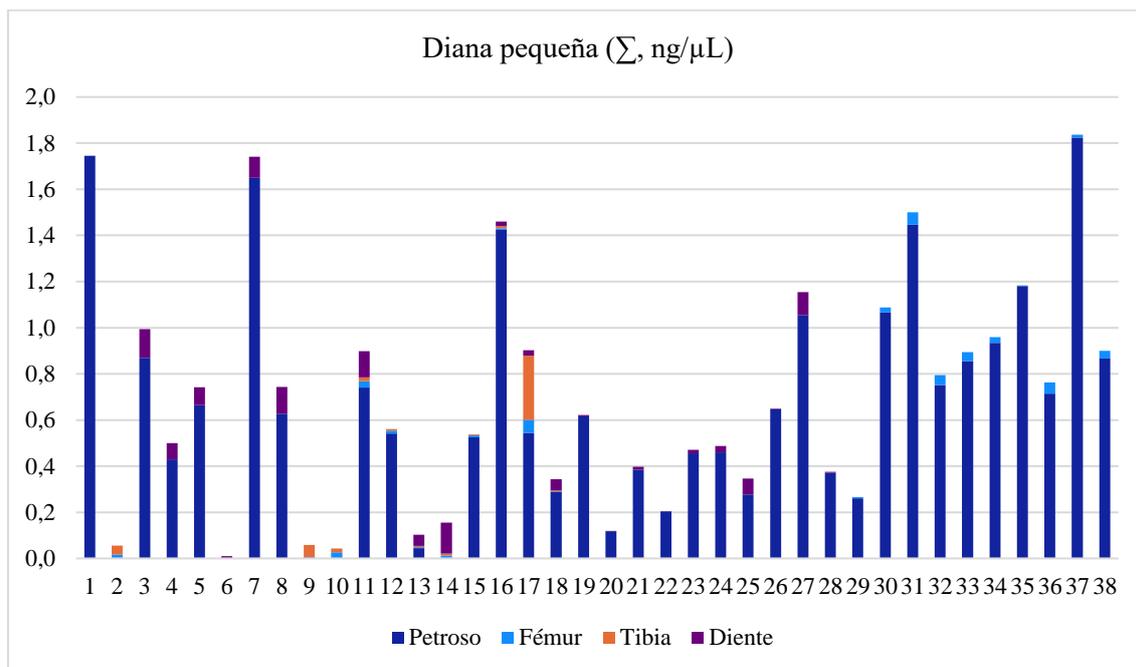


Figura 18. Cantidad de diana pequeña de ADN detectada por individuo. En todos los casos en los que había una muestra de petroso disponible se obtuvo mucho más ADN que con otras en el mismo individuo.

Si revisamos la literatura, una revisión sistemática encontró que la tibia es la que se señala como la que mejor rendimiento tiene por un mayor número de publicaciones científicas, seguida por el diente, teniendo ambos mejores comportamientos que el fémur [111]. El hueso petroso ha sido señalado por la literatura de ADN antiguo como la muestra con mayor cantidad de ADN endógeno, con un mayor daño de tipo C→T y una menor ratio ADN mitocondrial/ADN nuclear, con la sempiterna variación entre muestras [109]. La literatura forense encuentra mayor cantidad de ADN en los huesos largos [112] como la tibia [111,113,114], mientras que otros estudios obtienen mejores resultados con el hueso petroso más que con el fémur o los dientes [51,110,115–118]. El hueso petroso generalmente obtiene mayores cantidades de ADN y menores índices de degradación [117,119], Si comparamos fémur, tibia y diente, el primero ha sido tradicionalmente visto como el mejor en términos de éxito en el perfil genético, mientras que con el diente se obtienen generalmente mejores perfiles que con la tibia [48].

Nuestro estudio apoya la idea de que se obtiene una mayor cantidad de ADN a partir del hueso petroso que con otro tipo de muestras, teniendo este resto una gran variabilidad en términos de degradación, como se ha apuntado previamente [120]. De la comparativa entre los diferentes estudios puede deducirse una variabilidad de los resultados que puede explicarse por el muestreo sobre el hueso, pues se ha visto que el ADN no se distribuye uniformemente por el mismo [121,122].

Resultados de perfiles genéticos

Los resultados obtenidos con los perfiles genéticos (expresados como la media y el coeficiente de variación cuartílico) se presentan en la **Tabla 4**, y los diagramas de caja de cada parámetro por tipo de muestra en la **Figura 19**.

Tabla 4. Media y coeficiente de variación cuartílico (CQV) del número de los alelos detectados con altura mayor al umbral analítico (UA), umbral estocástico (UE), unidades de fluorescencia relativa (RFU) y loci reportables por tipo de muestra

	Fémur	Tibia	Diente	Petroso
Alelos > UA	24	23	30	29
CQV	0,278	0,321	0,197	0,156
Alelos > UE	12	12	19	20
CQV	0,628	0,714	0,590	0,136
RFU	744	1252	2278	5278
CQV	0,620	0,714	0,839	0,250
Loci reportable	10	10	13	15
CQV	0,632	0,565	0,505	0,172

El máximo de alelos detectados con altura mayor a 50 RFU fueron obtenidos por los dientes (30) y el petroso (29), seguidos por el fémur (24) y la tibia (23). Filtrando los resultados al umbral estocástico, el hueso petroso fue el mejor con 20 alelos en promedio, seguid por el diente (19), y el fémur y la tibia con 12. El hueso petroso también fue el que mayor RFU en promedio obtuvo, con 5278, seguido por el diente (2278), la tibia (1252) y el fémur (744). Así se explica que el tipo de muestra con mayor número de marcadores reportables fuera el petroso con 15 en promedio, seguido por el diente (13) y el fémur y la tibia (10).

Si establecemos una ratio de éxito basada en el número total de perfiles reportables obtenidos con esa muestra, el hueso petroso se convierte en el más exitoso con un 82%, siendo los dientes los segundos (59%), las muestras de fémur las terceras (52%) y las de tibia las que peor rendimiento tienen en este sentido (36%). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el petroso y el fémur en cuanto al número de alelos detectados por encima del umbral estocástico (p -valor=0,003) y el número de marcadores reportables (p -valor=0,021), y entre el hueso petroso y el resto de las muestras en la variable RFU promedio (p -valor<0,001).

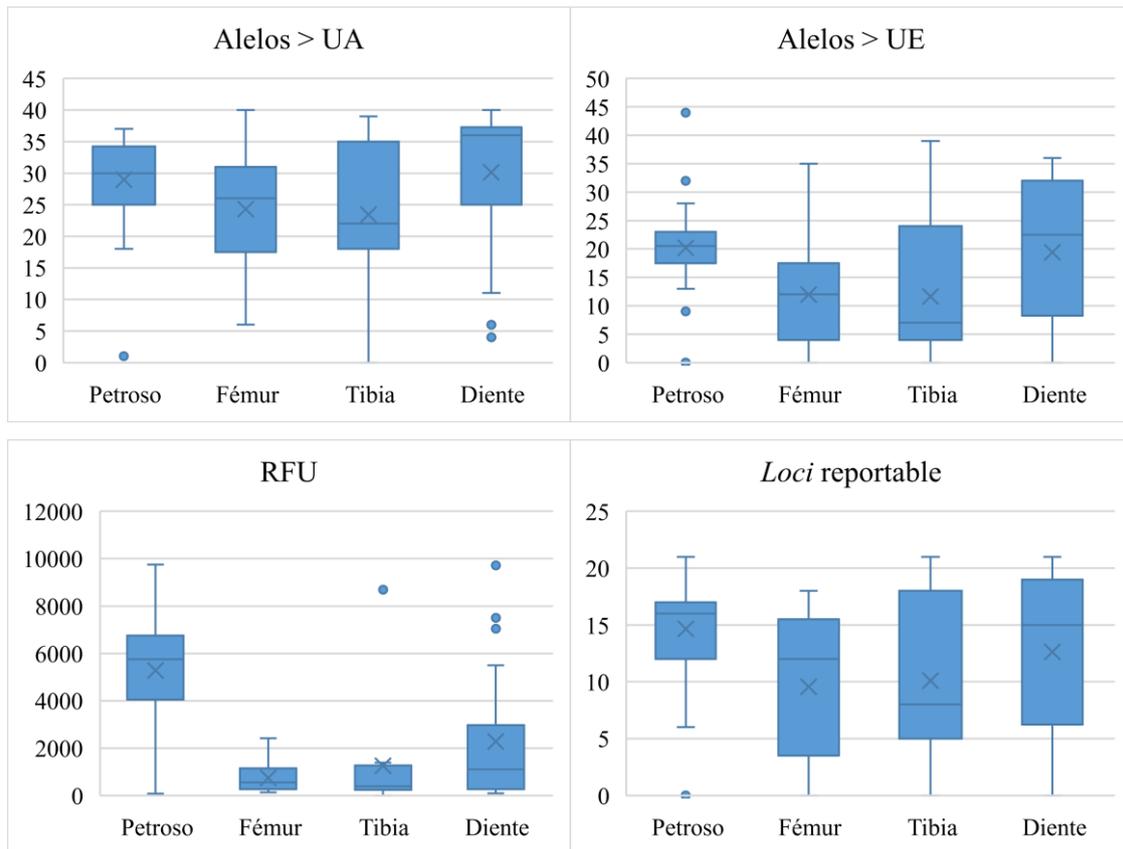


Figura 19. Diagramas de caja del número de alelos detectados (50 RFU), número de alelos que superan el umbral estocástico (365 RFU), unidades relativas de fluorescencia (RFU) y número de marcadores reportables por muestra

En la **Figura 20** se comparan los datos entre las muestras de un mismo individuo, observándose una cierta variabilidad en la medida en que en un caso la misma muestra que supera a las demás en términos de rendimiento se vuelve la peor en otro. En general, tanto con el hueso petroso como con los dientes se obtienen mejores resultados que con el fémur o la tibia. Es curioso observar que con el hueso petroso no se recupera la mayor cantidad de alelos en todos los casos pese a que en la cuantificación se obtenían del orden de 15 a 30 veces más cantidad de ADN que en los dientes. Hay ocasiones en las que se obtienen más alelos en los dientes, lo cual puede ser explicado por una mejor preservación del ADN en estos.

Sin embargo, el objetivo principal de un análisis genético es la obtención de un perfil reportable, y es aquí donde el hueso petroso sobrepasa en rendimiento al resto de muestras en el momento en el que del mismo se puede extraer una mayor cantidad de ADN, lo que produce más productos de amplificación, lo que lleva a que los alelos tengan una altura mayor y, por tanto, se obtengan perfiles más informativos. El Individuo 18 es un caso paradigmático de esta situación, en el que no se obtuvo información genética alguna con el fémur y la tibia, pero sí con el hueso petroso.

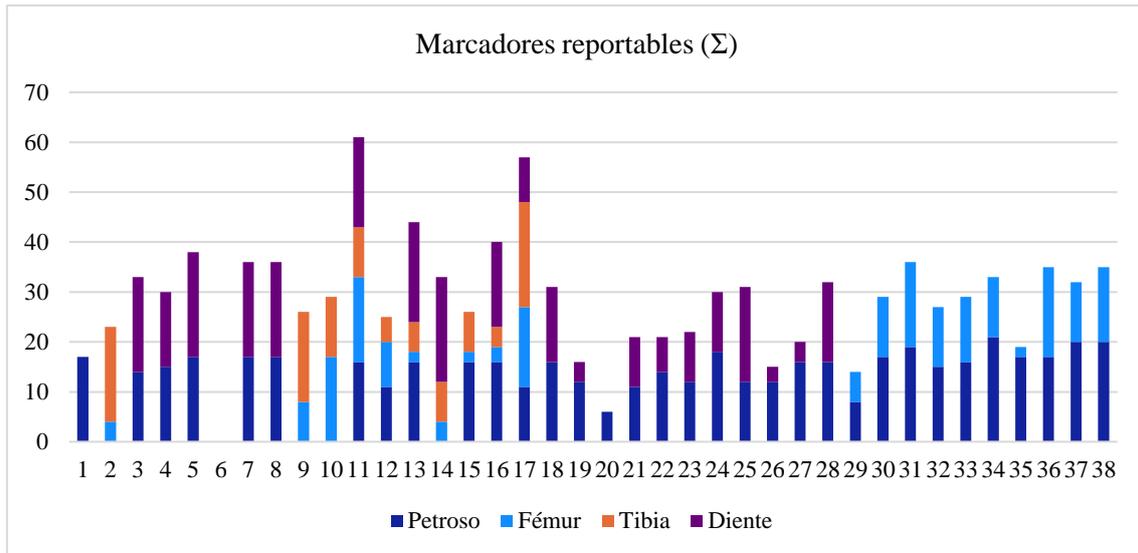


Figura 20. Número de marcadores reportables alcanzados por cada tipo de muestra por individuo

Las discrepancias entre los resultados arrojados por la cuantificación y los perfiles genéticos que finalmente se obtienen ya han sido discutidos por la literatura científica [123], y en lo que se refiere a este tipo de muestras, no solamente se han referido al análisis de STRs autosómicos, sino también al análisis de ADN mitocondrial [124]. Como vimos en la discusión de los datos de cuantificación, los huesos largos en general [112], y las muestras de fémur en particular [48,111,125] han sido reportados como las muestras de las que se obtiene un mejor perfil de ADN. Las muestras de dientes obtienen resultados sorprendentemente buenos si se tiene en cuenta la poca cantidad de ADN detectada en la cuantificación (comparándola con la obtenida por el hueso petroso), cosa que ya se ha apuntado [119]. Ambos dientes y petroso han sido señalados por los estudios de ADN antiguo como los mejores sustratos [109], y sin embargo encontramos investigaciones en las que los dientes producen mejores perfiles de ADN [126,127], incluso en muestras enterradas en condiciones espacio-temporales similares a las nuestras [113]. Y hay otros ejemplos en la literatura científica en los que el hueso petroso obtiene mejores perfiles que otros tipos de muestra [50,51,117,118]. Con todo, los organismos internacionales como la International Commission on Missing Persons (ICMP) siguen recomendado el muestreo de huesos largos o dientes para el análisis de ADN [128].

Con respecto al método de extracción de ADN, la literatura científica analizada usa diferentes protocolos: sílice en suspensión, sílice en columna, extracción automatizada o extracción orgánica. En nuestra investigación se escogió extraer las muestras con un protocolo interno basado en el uso del fenol/cloroformo/alcohol isoamílico precisamente porque se observó un mejor rendimiento.

Nuestra investigación apoya el hecho de que se obtienen mejores resultados genéticos con el hueso petroso o los dientes como muestra, alcanzándose mayores valores de alelos que

superaban el umbral analítico y estocástico, consiguiendo además el hueso petroso en torno al doble de RFU que los dientes (y estos a su vez el doble de RFU que los huesos largos). En general se han obtenido más perfiles reportables con el hueso petroso que con los dientes: de hecho, el 91% de los huesos petroso analizados obtuvieron más de 10 marcadores reportables, mientras que con los dientes fueron únicamente el 68% (52% en el caso del fémur y 45% en el caso de la tibia), lo que apoyaría esa idea.

En resumen, ambos dientes y hueso petroso aportaron los perfiles genéticos con el mayor número de alelos amplificados comparándolos con los huesos largos, siendo el hueso petroso la muestra con la que más perfiles reportables se obtuvieron, como ya se ha apuntado en la literatura [129]. Además, el hueso petroso aporta una mayor estabilidad en los resultados al observarse una menor variabilidad en los alelos obtenidos o los marcadores reportables a través de las diferentes muestras. A esto se añade el hecho de que si se obtiene una mayor cantidad de ADN con el hueso petroso puede resultar especialmente útil en aproximaciones de secuenciación masiva teniendo en cuenta el pequeño tamaño de amplicón requerido por estas plataformas [130]. Otra ventaja del petroso sobre el diente fue observada durante la preparación de las muestras, obteniéndose de 2 a 5 gramos de pulverizado con el primero, mientras que con el segundo se obtienen entre 0,5 y 1,5 gramos, lo que aporta más oportunidades de análisis. El muestreo también resulta más sencillo si los restos pertenecen a individuos jóvenes y las suturas craneales están abiertas.

A modo de ejemplo, en la **Figura 21** se muestran dos perfiles genéticos de dos restos óseos diferentes del mismo individuo, fémur y petroso. Con este último se consiguieron más alelos reportables, e incluso se produjeron fenómenos de *pull-up* espectral debido a la gran cantidad de ADN recuperada. En este sentido el análisis de ADN de hueso petroso puede hacer necesario ajustar el volumen de extracto que se introduce en la reacción para que no se den este tipo de artefactos; y como anotación, debe decirse que una mayor altura de picos hace que la edición de perfiles de hueso petroso lleve menos tiempo.

No obstante, debemos tener en cuenta que el cráneo no siempre está disponible o en buenas condiciones, dependiendo de las condiciones de enterramiento, más teniendo en cuenta que los antropólogos nos han reportado que el tiro de gracia puede destruir o afectar gravemente a la integridad del hueso petroso. A esto se le añaden las cuestiones éticas que ha suscitado en los círculos arqueológicos el uso de esta muestra por ser destructivo [53].

El objetivo de este trabajo era evaluar la eficiencia de los cuatro tipos principales de muestra que la literatura científica apuntaba como los mejores para obtener un perfil de ADN mediante datos de cuantificación y de los perfiles genéticos, teniendo en cuenta los criterios de calidad de los alelos detectados. Además, esta investigación se ha llevado a cabo en restos

humanos especialmente desafiantes, debido a las condiciones extremas en las que se han encontrado.

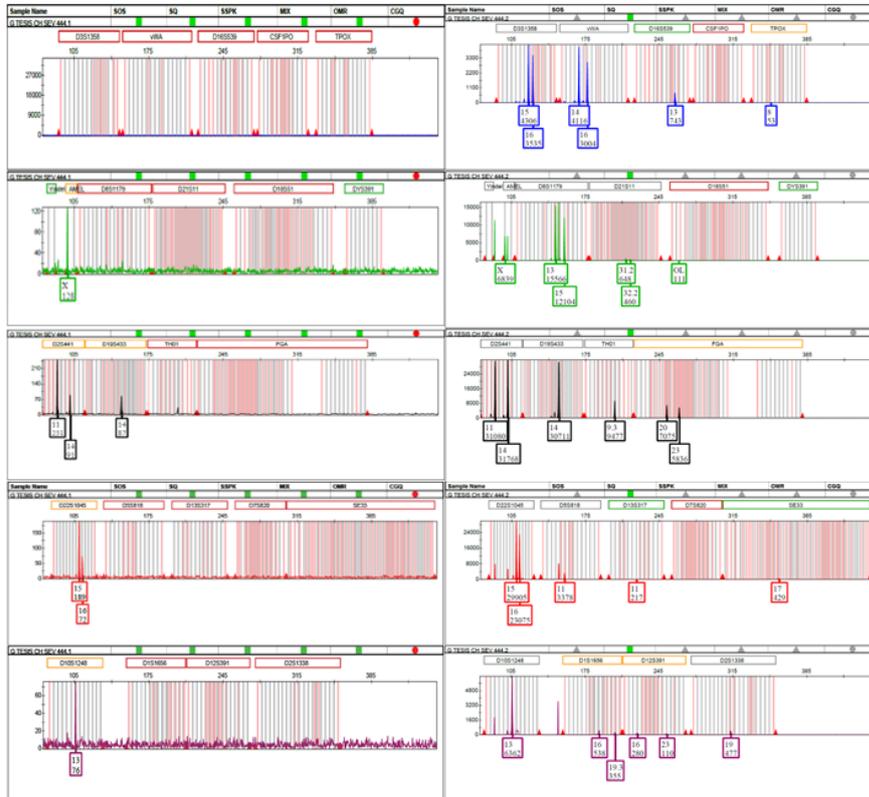


Figura 21. Dos perfiles genéticos del mismo individuo generados con dos muestras diferentes: fémur (izquierda) y hueso petroso (derecha)

8. Conclusiones

Fémur, tibia, los dientes y, más recientemente, el hueso petroso, han sido indicados en la literatura científica como las muestras con un mayor porcentaje de éxito en el análisis de ADN. Sin embargo, las investigaciones que se han hecho sobre el tema difieren en cuál tiene mejor rendimiento, debido a la distribución no uniforme del ADN en la muestra, diferencias individuales, factores ambientales y la técnica de muestreo.

Siguiendo la línea marcada por investigaciones anteriores, nuestro estudio encuentra que se obtienen mayores cantidades de ADN en la extracción con el hueso petroso que con diente, fémur o tibia, y a pesar de que aproximadamente se obtiene la misma cantidad de alelos con dientes y petroso, el último consigue un mayor número de marcadores reportables, lo que conduce a la obtención de perfiles genéticos más informativos.

En conclusión, tanto el hueso petroso como los dientes constituyen unas muestras recomendadas a tomar cuando se va a efectuar un análisis de ADN en restos humanos críticos. Este conocimiento nos ha permitido mejorar la tasa de éxito en los análisis que se están efectuando en la actualidad.

9. Referencias

- [1] W. Platzer, Atlas de Anatomía 1. Aparato locomotor, Omega, Barcelona, 2003.
- [2] H. Fritsch, W. Kühnel, Atlas de Anatomía 2. Órganos internos, Omega, Barcelona, 2003.
- [3] A. Brüel, E.I. Christensen, J. Tranum-Jensen, K. Qvortrup, F. Geneser, Histología, Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2012.
- [4] J.S. Lowe, P.G. Anderson, Histología humana, Elsevier, Madrid, 2015.
- [5] J.A. Gisbert Calabuig, E. Villanueva Cañadas, Medicina Legal y Toxicología, Elsevier Masson, Madrid, 2004.
- [6] J. Pinheiro, Decay Process of a Cadaver, in: A. Schmitt, E. Cunha, J. Pinheiro (Eds.), Forensic Anthropology and Medicine, Humana Press, 2006: pp. 85–116.
- [7] H. Schroeder, H. Klotzbach, L. Oesterhelweg, K. Püschel, Larder beetles (Coleoptera, Dermestidae) as an accelerating factor for decomposition of a human corpse, Forensic Science International. 127 (2002) 231–236.
- [8] U. Krenzer, Tomo II Métodos para la determinación del sexo, in: Compendio de Métodos Antropológico Forenses Para La Reconstrucción Del Perfil Osteo-Biológico, Centro de Análisis Forense y Ciencias Aplicadas, Guatemala, 2005: pp. 1–24.
- [9] U. Krenzer, Tomo III Estimación de la edad osteológica en adultos, in: 1ª Edición (Ed.), Compendio de Métodos Antropológico Forenses Para La Reconstrucción Del Perfil Osteo-Biológico, Centro de Análisis Forense y Ciencias Aplicadas, Guatemala, 2005: pp. 1–73.
- [10] T.L. Rogers, Skeletal Age Estimation, in: S. Blau, D.H. Ubelaker (Eds.), Handbook of Forensic Anthropology and Archeology, Routledge, New York, 2016: pp. 279–293.
- [11] D. Higgins, A.B. Rohrlach, J. Kaidonis, G. Townsend, J.J. Austin, Differential Nuclear and Mitochondrial DNA Preservation in Post-Mortem Teeth with Implications for Forensic and Ancient DNA Studies, PLOS ONE. 10 (2015) e0126935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126935>.
- [12] U. Krenzer, Tomo VIII Traumas y Paleopatología, in: Compendio de Métodos Antropológico Forenses Para La Reconstrucción Del Perfil Osteo-Biológico, Centro de Análisis Forense y Ciencias Aplicadas, Guatemala, 2005: pp. 1–82.
- [13] S. Fiedler, M. Graw, Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere, Naturwissenschaften. 90 (2003) 291–300.
- [14] E.J. Well, C. Augustin, B. Busse, A. Fuhrmann, M. Hahn, M. Tsokos, M. Verhoff, F. Schulz, The assessment of adipocere to estimate the post-mortem interval - a skeleton from the tidelands, Anthropol. Anz. 73/3 (2016) 235–247.
- [15] J. Buckleton, C.M. Triggs, S.J. Walsh, eds., Forensic DNA Evidence Interpretation, CRS Press, Boca Raton, 2005.
- [16] E. M.J. Schotsmans, J. Denton, J. Dekeirsschietter, T. Ivaneanu, S. Leentjes, R.C. Janaway, A.S. Wilson, Effects of hydrated lime and quicklime on the decay of buried human remains using pig cadavers as human body analogues, Forensic Science International. 217 (2012) 50–59.
- [17] E.M.J. Schotsmans, J.N. Fletcher, J. Denton, R.C. Janaway, A.S. Wilson, Long-term effects of hydrated lime and quicklime on the decay of human remains using pig cadavers as human body analogues: Field experiments, Forensic Science International. 238 (2014) 141.e1–141.e13.
- [18] C.M. Nielsen-Marsh, C.I. Smith, M.M.E. Jans, A. Nord, H. Kars, M.J. Collins, Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations, Journal of Archeological Science. 34 (2007) 1523–1531.
- [19] J. Bickley, J.K. Short, D.G. McDowell, H.C. Parkes, Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions, Letters in Applied Microbiology. 22 (1996) 153–158.
- [20] A. Corpus, Hallan 240 cuerpos en fosa de “Pozolero,” Reforma. (2018).
- [21] E. Vermeij, P. Zoon, M. van Wijk, R. Gerretsen, Microscopic Residues of Bone from Dissolving Human Remains in Acids, Journal of Forensic Sciences. 60 (2015) 770–776.
- [22] K. Sowmya, U.S. Sudheendra, S. Khan, N. Nagpal, S.J. Prathamesh, Assessment of morphological changes and DNA quantification: An in vitro study on acid-immersed teeth, Journal of Forensic Dental Sciences. 5 (2013) 42–46.
- [23] Europa Press, El Instituto Forense de la USC concluye que resulta “imposible” obtener ADN de los restos de Las Quemadillas, AMP. (2012).
- [24] T. Krap, F.W.W. van de Goot, R.-J. Oostra, W. Dujist, A.L. Waters-Rist, Temperature estimations of heated bone: A questionnaire-based study of accuracy and precision of interpretation of bone color by forensic and physical anthropologists, Legal Medicine. 29 (2017) 22–28.
- [25] T. Tsuchimochi, M. Iwasa, Y. Maeno, H. Koyama, H. Inoue, I. Isobe, R. Matoba, M. Yokoi, M. Nagao, Chelating Resin-Based Extraction of DNA from Dental Pulp and Sex Determination from

- Incinerated Teeth with Y-Chromosomal Aliphoid Repeat and Short Tandem Repeats, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 23 (2002) 268–271.
- [26] S.C. Zapico, J.A. Garriga, D.H. Ubelaker, Efficiency of human DNA isolation and STR profiling from burn teeth, in: *Human Identification Solutions*, Madrid, 2015.
- [27] D.R. Redsicker, J.J. O'Connor, *Practical Fire and Arson Investigation*, CRC Press, Boca Raton, 1996.
- [28] D.H. Ubelaker, The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis, *Forensic Science International*. 183 (2008) 1–5.
- [29] M.S. Petrik, N.R. Hobinschack, G.S. Anderson, Examination of factors surrounding human decomposition in freshwater: a review of body recoveries and coroner cases in British Columbia, *Canadian Society of Forensic Science Journal*. 37 (2004) 9–17.
- [30] G.S. Anderson, L.S. Bell, Impact of Marine Submergence and Season on Faunal Colonization and Decomposition of Pig Carcasses in the Salish Sea, *PLoS ONE*. 11 (2016) e149107.
- [31] G. Vacchiano, G. Vyshka, Skeletal Remains Submerged in Mediterranean Sea for Eight Years: Histological Observations, *Anthropology*. 2 (2015) 1–3.
- [32] K. Crainic, F. Paraire, M. Leterreux, M. Durigon, P. de Mazancourt, Skeletal Remains Presumed Submerged in Water for Three Years Identified Using PCR-STR, *Journal of Forensic Science*. 47 (2002) 1–3.
- [33] E. Graham, Effects of Different Types of Water on the Degradation Rate of Human DNA in Bone and Tissue, New Haven Forensic Science Department. (2014).
- [34] J. Hunter, B. Simpson, C.S. Colls, *Forensic Approaches to Buried Remains*, Wiley-Blackwel, Oxford, 2013.
- [35] J.-P. Fernández-Álvarez, D. Rubio-Melendi, A. Martínez-Velasco, J.K. Pringle, H.-D. Aguilera, Discovery of a mass grave from the Spanish Civil War using Ground Penetrating Radar and forensic archeology, *Forensic Science International*. 267 (2016) e10–e17.
- [36] D. Abate, C.S. Colls, N. Moysi, D. Karsili, M. Faka, A. Anilir, S. Manolis, Optimizing search strategies in mass grave location through the combination of digital technologies, *Forensic Science International: Synergy*. 1 (2019) 95–107.
- [37] A. Ruffel, B. Kulesa, Application of Geophysical Techniques in Identifying Illegally Buried Toxic Waste, *Environmental Forensics*. 10 (2009) 196–207.
- [38] A.G. Brown, The use of forensic botany and geology in war crimes investigations in NE Bosnia, *Forensic Science International*. 163 (2006) 204–210.
- [39] A. Witten, R. Brooks, T. Fenner, The Tulsa Race Riot of 1921: A Geophysical study to locate a mass grave, *The Leading Edge*. 20 (2001) 655–660.
- [40] A.E. Lassester, K.P. Jacobi, R. Farley, L. Hansel, Cadaver Dog and Handler Team Capabilities in the Recovery of Buried Human Remains in the Southeastern United States, *Journal of Forensic Science*. 48 (2003) 1–5.
- [41] E. Harris, The laws of archeological stratigraphy, in: *Principles of Archeological Stratigraphy*, Academic Press, 1979: pp. 29–40.
- [42] I.D. Hanson, The importance of stratigraphy in forensic investigation, *Forensic Geoscience: Principles, Techniques and Applications*. 232 (2004) 39–47.
- [43] C.J. Jnüsel, J. Robb, Funerary taphonomy: An overview of goals and methods, *Journal of Archeological Science: Reports*. 10 (2016) 655–673.
- [44] S. Haynes, J.B. Searle, A. Bretman, K.M. Dobney, Bone preservation and ancient DNA: The application of screening methods for predicting DNA survival, *Journal of Archaeological Science*. 29 (2002) 585–592. <https://doi.org/10.1006/JASC.2001.0731>.
- [45] B. Llamas, G. Valverde, L. Fehren-Schmitz, L.S. Weyrich, A. Cooper, W. Haak, From the field to the laboratory: Controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era, *STAR: Science & Technology of Archeological Research*. 3 (2017) 1–14.
- [46] S. Scott, R.L. Jantz, Survivability versus rate of recovery for skeletal elements in forensic anthropology, *Journal of Forensic Sciences*. 67 (2022) 1758–1765. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15087>.
- [47] S.M. Edson, J.P. Ross, M.D. Coble, T.J. Parsons, S.M. Barritt, Naming the Dead — Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains, *Forensic Science Review*. 16 (2004) 64–89.
- [48] A. Miloš, A. Selmanović, L. Smajlović, R.L.M. Huel, A.R. Cheryl Katzmarzyk, T.J. Parsons, Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements, *Croatian Medical Journal*. 48 (2007) 486–493.

- [49] C. Gamba, E.R. Jones, M.D. Teasdale, R.L. McLaughlin, G. Gonzalez-Fortes, V. Mattiangeli, L. Domboróczki, I. Kóvári, I. Pap, A. Anders, A. Whittle, J. Dani, P. Raczky, T.F.G. Higham, M. Hofreiter, D.G. Bradley, R. Pinhasia, Genome flux and stasis in a five millenium transect of European prehistory, *Nature Communications*. 21 (2014) 5257.
- [50] A. Gonzalez, C. Cannet, V. Zvéngorosky, A. Geraut, G. Koch, T. Delabarde, B. Ludes, J.-S. Raul, C. Keyser, The petrous bone: Ideal substrate in legal medicine?, *Forensic Science International: Genetics*. 47 (2020) 102305.
- [51] E. Pilli, S. Vai, M.G. Caruso, G. D'Errico, A. Berti, D. Caramelli, Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archeological bone samples via forensic approach, *Forensic Science International*. 283 (2018) 144–149.
- [52] D. Gaudio, D.M. Fernandes, R. Schmidt, O. Cheronet, D. Mazzarelli, M. Mattia, T. O'Keefe, R.N.M.M. Feeney, C. Cattaneo, R. Pinhasi, T. O'Keefe, R.N.M.M. Feeney, C. Cattaneo, R. Pinhasi, T. O'Keefe, R.N.M.M. Feeney, C. Cattaneo, R. Pinhasi, Genome-Wide DNA from Degraded Petrous Bones and the Assessment of Sex and Probable Geographic Origins of Forensic Cases, *Scientific Reports*. 9 (2019) 8226.
- [53] S. Charlton, T. Booth, I. Barnes, The problem with petrous? A consideration of the potential biases in the utilization of pars petrosa for ancient DNA analysis, *World Archeology*. 51 (2019) 574–585.
- [54] K. Sirak, D. Fernandes, O. Cheronet, E. Harney, M. Mah, S. Mallick, N. Rohland, N. Adamski, N. Broomandkhoshbacht, K. Callan, F. Candilio, J.K.S. Lawson, Ann Marie Kirsten Mandl Oppenheimer, F. Zalzal, A. Anders, J. Bartík, A. Coppa, T. Dashtseveg, S. Évinger, Z. Farkaš, T. Hajdu, J. Bayarsaikhan, L. McIntyre, V. Moiseyev, M. Okumura, I. Pap, M. Pietrusewsky, P. Raczky, A. Šefčáková, A. Soficaru, T. Szeniczey, B.M. Szőke, D.V. Gerven, S. Vasilyev, L. Bell, D. Reich, R. Pinhasi, Human auditory ossicles as an alternativa optimal source of ancient DNA, *Genome Research*. 30 (2020) 427–436.
- [55] International Commission on Missing Persons, Standard operating procedure for sampling bone and tooth specimens from human remains for DNA testing at the ICMP, (2015).
- [56] M.J. Collins, C.M. Nielsen-Marsh, J. Hiller, C.I. Smith, J.P. Roberts, R.V. Prigodich, T.J. Wess, J. Csapò, A.R. Millard, G. Turner-Walker, The survival of organic matter in bone: a review, *Archaeometry*. 44 (2002) 383–394.
- [57] H.N. Poinar, M. Höss, J.L. Bada, S. Pääbo, Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA, *Science*. 272 (1996) 864–866.
- [58] H.N.P. and B.A. Stankiewicz, Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (1999) 8426–8431.
- [59] C. Cattaneo, S. DiMartino, S. Scali, O.E. Craig, M. Grandi, R.J. Sokol, Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques, *Forensic Science International*. 102 (1999) 181–191.
- [60] K. Imaizumi, K. Taniguchi, Y. Ogawa, DNA survival and physical and histological properties of heat-induced alterations in burnt bones, *International Journal of Legal Medicine*. 128 (2014) 439–446.
- [61] T. Lindahl, O. Karlström, Heat-Induced Depyrimidination of Deoxyribonucleic Acid in Neutral Solution, *Biochemistry*. 12 (1973) 5151–5154.
- [62] B. Gršković, D. Zrnec, M. Popović, M.J. Petek, D. Primorac, G. Mršić, Effect of ultraviolet C radiation on biological samples, *Croatian Medical Journal*. 54 (2013) 263–271.
- [63] B.S. Rosenstein, R.B. Rosenstein, Survival, excision repair and inhibition of DNA synthesis in normal human skin fibroblasts exposed to simulated sunlight, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 16 (1992) 247–255.
- [64] D.L. Andrews, Electromagnetic Radiation, in: J.C. Lindon (Ed.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Academic Press, Oxford, 2017: pp. 427–431.
- [65] A. Hall, L.M. Sims, J. Ballantyne, Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: Forensic implications, *Forensic Science International: Genetics*. 8 (2014) 24–32.
- [66] A. Hall, J. Ballantyne, Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 380 (2004) 72–83.
- [67] M.F. Pita López, El clima de Andalucía, in: A. López Ontiveros (Ed.), *Geografía de Andalucía*, Ariel, Barcelona, 2003: pp. 137–174.
- [68] Junta de Andalucía, Insolación y temperatura, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. (n.d.). <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9e>

- be205510e1ca/?vgnextoid=f47996f06f245310VgnVCM1000001325e50aRCRD&vgnnextchannel=23f996f06f245310VgnVCM1000001325e50aRCRD (accessed June 30, 2020).
- [69] J. Gómez-Zotano, J. Alcántara-Manzanares, J.A. Olmedo-Cobo, E. Martínez-Ibarra, La sistematización del clima mediterráneo: identificación, clasificación y caracterización climática de Andalucía (España), *Revista de Geografía Norte Grande*. 61 (2015) 161–180.
- [70] J. Porta Casanellas, M. López-Acevedo Reguerín, C. Roquero de Laburu, *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*, Mundi-Prensa, Madrid, 2003.
- [71] K.E. Latham, J.J. Miller, DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts, *Forensic Sciences Research*. 4 (2019) 51–59. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1515594>.
- [72] A. Barbaro, P. Cormaci, A. Barbaro, Study about the effect of high temperatures on STRs typing, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 1 (2008) 92–94.
- [73] A.-K. NM, J. Singh, V.C. Sangar, Time-dependent effects of temperature and humidity on quantity of DNA in samples of human saliva, blood and semen in Kuwait, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 14 (2016) 2852–2873.
- [74] M.E. Allentoft, M. Collins, D. Harker, J. Haile, C.L. Oskam, M.L. Hale, P.F. Campos, J.A. Samaniego, M.T.P. Gilbert, E. Willerslev, G. Zhang, R.P. Scofield, R.N. Holdaway, M. Bunce, The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dates fossils, *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*. 279 (2012) 4724–4733.
- [75] J. Burger, S. Hummel, B. Herrmann, W. Henke, DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis*. 20 (1999) 1722–1728.
- [76] R. Chang, K.A. Glodsbys, Ácidos y bases, in: *Química*, McGraw-Hill Interamericana, México D.F., 2017: pp. 666–719.
- [77] E.L. Uhlenhopp, A.I. Krasna, Denaturation of DNA at pH 7.0 by Acid and Alkali, *Nature*. 223 (1969) 1267–1269.
- [78] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Macmillan Higer Education, Basingstoke, 2017.
- [79] T.E. Creighton, *The Biophysical Chemistry of Nucleic Acids & Proteins*, Helvetian Press, 2010.
- [80] G.W. Thomas, Soil pH and Soil Acidity, in: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, M.E. Sumner (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*, SSSA Book Series, Madison, 1996: pp. 475–490.
- [81] G. Monge Gómez, J. Rodríguez Pérez, J.A. Rodríguez Álvarez, M. Anaya Romero, D. De la Rosa, Generación de mapas lito-edaforológicos de Andalucía, *Mapping*. 124 (2008) 38–45.
- [82] G. Romanowski, M.G. Lorenz, W. Wackernagel, Adsorption of Plasmid DNA to Mineral Surfaces and Protection against DNase I, *Applied and Environmental Microbiology*. Apr. (1991) 1057–1061.
- [83] A.J. Alvarez, M. Khanna, A. Toranzos, G. Stotzky, Amplification of DNA bound on clay minerals, *Molecular Ecology*. 7 (1998) 775–778.
- [84] L.G. Combs, J.E. Warren, V. Huynh, J. Castaneda, T.D. Golden, R.K. Roby, The effects of metal ion PCR inhibitors on results obtained with the Quantifiler Human DNA Quantification Kit, *Forensic Science International: Genetics*. 19 (2015) 180–189.
- [85] A. Kuffel, A. Gray, N.N. Daeid, Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency, *International Journal of Legal Medicine*. (2020).
- [86] F.J. Stevenson, *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions*, Wiley, New York, 1994.
- [87] J.I. Kim, G. Buckau, G.H. Li, H. Duschner, N. Psarros, Characterization of humic and fulvic acids from Gorleben groundwater, *Fresenius J Anal Chem*. 338 (1990) 245–252.
- [88] D. Sutlovic, S. Gamulin, M. Definis-Gojanovic, D. Gugic, S. Andjelinovic, Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics, *Electrophoresis*. 29 (2008) 1467–1472.
- [89] D. Gerceker, D. Karasartova, E. Elyürek, S. Barkar, M. Kiyan, T.M. Özsan, M.K. Calgin, F. Sahin, A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test, *J. Gen. Appl. Microbiol*. 55 (2009) 291–294.
- [90] S. Ocampo Aranda, *Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizosfera de olivo (Olea europaea L. subsp. europaea) en Andalucía*, Universidad de Córdoba, 2010.
- [91] C. Kendall, A.M.H. Eriksen, I. Kontopoulos, M.J. Collins, G. Turner-Walker, Diagenesis of archaeological bone and tooth, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 491 (2018) 21–37. <https://doi.org/10.1016/J.PALAEO.2017.11.041>.
- [92] E.R. Hyde, D.P. Haarmann, A.M. Lynne, S.R. Bucheli, J.F. Petrosino, The Living Dead: Bacterial Community Structure of a Cadaver at the Onset and End of the Bloat Stage of Decomposition, *PLoS One*. 8 (2013) e77733.

- [93] R.C. Janaway, S.L. Percival, A.S. Wilson, Decomposition of Human Remains, in: S.L. Percival (Ed.), *Microbiology and Aging*, Humana Press, 2009.
- [94] A.L. Emmons, A.Z. Mundorff, S.W. Keenan, J. Davoren, J. Andronowski, D.O. Carter, J.M. DeBruyn, Characterizing the postmortem human bone microbiome from surface-decomposed remains, *PLOS ONE*. 15 (2020) e0218636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218636>.
- [95] A.L. Emmons, A.Z. Mundorff, K.M. Hoeland, J. Davoren, S.W. Keenan, D.O. Carter, S.R. Campagna, J.M. DeBruyn, Postmortem Skeletal Microbial Community Composition and Function in Buried Human Remains, *mSystems*. 7 (2022). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00041-22/FORMAT/EPUB>.
- [96] S.E. Schmedes, A. Sajantila, B. Budowle, Expansion of Microbial Forensics, *Journal of Clinical Microbiology*. 54 (2016) 1964–1974.
- [97] L. Kistler, R. Ware, O. Smith, M. Collins, R.G. Allaby, A new model for ancient DNA decay based on paleogenomic meta-analysis, *Nucleic Acids Research*. 45 (2017) 202–211.
- [98] A. Cooper, H. Poinar, Ancient DNA: Do It Right or Not at All, *Science*. 289 (2000) 1139.
- [99] R.E. Green, A.W. Briggs, J. Krause, K. Prüfer, H.A. Burbano, M. Siebauer, M. Lachmann, S. Pääbo, The Neandertal genome and ancient DNA authenticity, *EMBO Journal*. 28 (2009) 2494–2502. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.222>.
- [100] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic Analyses from Ancient DNA, *Annual Review of Genetics*. 38 (2004) 645–679.
- [101] D. Marjanović, A. Durmić-Pašić, N. Bakal, S. Haverić, B. Kalamujić, L. Kovačević, J. Ramić, N. Pojskić, V. Škaro, P. Projić, K. Bajrović, R. Hadžiselimović, K. Drobnić, E. Huffine, J. Davoren, D. Primorac, DNA Identification of Skeletal Remains from World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia Forensic Science Forensic Science, *Croatian Medical Journal*. 48 (2007) 513–519.
- [102] S.W. Carlyle, R.L. Parr, M.G. Hayes, D.H. O'Rourke, Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest, *American Journal of Physical Anthropology*. 113 (2000) 85–101.
- [103] M.N. Hochmeister, B. Budowle, Urs.V. Borer, U. Eggmann, C.T. Comey, R. Dirnhofer, Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains, *Journal of Forensic Sciences*. 36 (1991) 1649–1661. <https://doi.org/10.1520/JFS13189J>.
- [104] C. Haarkötter, X. Gálvez, D.C. Vinuesa-Espinosa, M.I. Medina-Lozano, M. Saiz, J.A. Lorente, J.C. Álvarez, A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains, *Forensic Science International*. 348 (2023) 111730. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111730>.
- [105] Thermo Fisher Scientific, Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits, User Guide. (2018). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf> (accessed July 29, 2021).
- [106] ThermoFisher Scientific, GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits, User Guide. (2019). <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2F4477604.pdf>.
- [107] The jamovi project, jamovi (Version 2.2.5), (2021). <https://www.jamovi.org> (accessed July 5, 2022).
- [108] M. Hofreiter, J. Sneberger, M. Pospisek, D. Vanek, Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA, *Forensic Science International: Genetics*. 54 (2021) 102538. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102538>.
- [109] H.B. Hansen, P.B. Damgaard, A. Margaryan, J. Stenderup, N. Lynnerup, E. Willerslev, M.E. Allentoft, Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum, *PLOS ONE*. 12 (2017) e0170940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940>.
- [110] A. Šuligoj, S. Mesesnel, T. Leskovar, E. Podovšovnik, I. Zupanič Pajnič, Comparison of DNA preservation between adult and non-adult ancient skeletons, *Int J Legal Med*. (2022). <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02881-3>.
- [111] C. Finaughty, L.J. Heathfield, V. Kemp, N. Márquez-Grant, Forensic DNA extraction methods for human hard tissue: A systematic literature review and meta-analysis of technologies and sample type, *Forensic Science International: Genetics*. 63 (2023) 102818. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102818>.
- [112] R.W. Allen, J. Pritchard, J. Fu, An analysis of data curated from 5 years of identifying human remains, *Journal of Forensic Sciences*. 68 (2023) 614–620. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15195>.
- [113] M. Baeta, C. Núñez, S. Cardoso, L. Palencia-Madrid, L. Herrasti, F. Etxeberria, M.M. de Pancorbo, Digging up the recent Spanish memory: genetic identification of human remains from mass graves

- of the Spanish Civil War and posterior dictatorship, *Forensic Science International: Genetics*. 19 (2015) 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.09.001>.
- [114] M.V. Emery, K. Bolhofner, S. Winingear, R. Oldt, M. Montes, S. Kanthaswamy, J.E. Buikstra, L.C. Fulginiti, A.C. Stone, Reconstructing full and partial STR profiles from severely burned human remains using comparative ancient and forensic DNA extraction techniques, *Forensic Science International: Genetics*. 46 (2020) 102272. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102272>.
- [115] C. Parker, A.B. Rohrlach, S. Friederich, S. Nagel, M. Meyer, J. Krause, K.I. Bos, W. Haak, A systematic investigation of human DNA preservation in medieval skeletons, *Sci Rep.* 10 (2020) 18225. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75163-w>.
- [116] M. Obal, I. Zupanič Pajnič, B. Gornjak Pogorelc, T. Zupanc, Different skeletal elements as a source of DNA for genetic identification of Second World War victims, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 7 (2019) 27–29. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.013>.
- [117] G. Kulstein, T. Hadrys, P. Wiegand, As solid as a rock—comparison of CE- and MPS-based analyses of the petrosal bone as a source of DNA for forensic identification of challenging cranial bones, *Int J Legal Med.* 132 (2018) 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1653-z>.
- [118] D.C. Vinuesa-Espinosa, C. Santos, C. Martínez-Labarga, A. Malgosa, Human DNA extraction from highly degraded skeletal remains: How to find a suitable method?, *Electrophoresis*. 41 (2020) 2149–2158. <https://doi.org/10.1002/elps.202000171>.
- [119] A. Senst, A. Caliebe, M. Drum, C. Cossu, M. Zieger, E. Scheurer, I. Schulz, Recommendations for the successful identification of altered human remains using standard and emerging technologies: Results of a systematic approach, *Forensic Science International: Genetics*. 62 (2023) 102790. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102790>.
- [120] I. Zupanič Pajnič, J. Inkret, T. Zupanc, E. Podovšovnik, Comparison of nuclear DNA yield and STR typing success in Second World War petrous bones and metacarpals III, *Forensic Science International: Genetics*. 55 (2021) 102578. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102578>.
- [121] R. Pinhasi, D. Fernandes, K. Sirak, M. Novak, S. Connell, S. Alpaslan-Roodenberg, F. Gerritsen, V. Moiseyev, A. Gromov, P. Raczky, A. Anders, M. Pietruszewsky, G. Rollefson, M. Jovanovic, H. Trinhhoang, G. Bar-Oz, M. Oxenham, H. Matsumura, M. Hofreiter, Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone, *PLOS ONE*. 10 (2015) e0129102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129102>.
- [122] F. Alberti, J. Gonzalez, J.L.A. Pajmans, N. Basler, M. Preick, K. Henneberger, A. Trinks, G. Rabeder, N.J. Conard, S.C. Münzel, U. Joger, G. Fritsch, T. Hildebrandt, M. Hofreiter, A. Barlow, Optimized DNA sampling of ancient bones using Computed Tomography scans, *Molecular Ecology Resources*. 18 (2018) 1196–1208. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12911>.
- [123] M. Poetsch, H. Konrad, J. Helmus, T. Bajanowski, N. von Wurmb-Schwark, Does zero really mean nothing?—first experiences with the new PowerQuant™ system in comparison to established real-time quantification kits, *International Journal of Legal Medicine*. 130 (2016) 935–940. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1352-1>.
- [124] M. Obal, T. Zupanc, I. Zupanič Pajnič, Comparison of Quantitative PCR Results for Mitochondrial DNA in Relation to Nuclear DNA Isolated from Second World War Mass Grave Skeletal Remains, SSRN, 2023. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4349048>.
- [125] E. Johnston, M. Stephenson, DNA Profiling Success Rates from Degraded Skeletal Remains in Guatemala, *Journal of Forensic Sciences*. 61 (2016) 898–902. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13087>.
- [126] D.Z.C. Hines, M. Vennemeyer, S. Amory, R.L.M. Huel, I. Hanson, C. Katzmarzyk, T.J. Parsons, Prioritized Sampling of Bone and Teeth for DNA Analysis in Commingled Cases, in: *Commingled Human Remains*, Elsevier, 2014: pp. 275–305. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405889-7.00013-7>.
- [127] Ž.M. Geršak, I. Zupanič Pajnič, M. Črešnar, T. Zupanc, Determination of DNA yield rates in six different skeletal elements in ancient bones, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 7 (2019) 120–122. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.047>.
- [128] Ambers, Angie, Skeletal microstructure and pre-processing techniques for DNA testing, in: Ambers, Angie (Ed.), *Forensic Genetic Approaches for Identification of Human Skeletal Remains. Challenges, Best Practices, and Emerging Technologies*, Elsevier, San Diego, 2023: pp. 81–117.
- [129] T. Zupanc, E. Podovšovnik, M. Obal, I. Zupanič Pajnič, High DNA yield from metatarsal and metacarpal bones from Slovenian Second World War skeletal remains, *Forensic Science International: Genetics*. 51 (2021) 102426. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102426>.
- [130] K.B. Gettings, K.M. Kiesler, P.M. Vallone, Performance of a next generation sequencing SNP assay on degraded DNA, *Forensic Science International: Genetics*. 19 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.04.010>.

10. Anexo. Datos suplementarios

Muestra	Tipo	QTRIO corto	QTRIO largo	QTRIO Y	QTRIO deg	Alelos >UA	Alelos >UE	RFU	Marcadores reportables
1	Petroso	1,745	0,119	1,601	15	32	22	7624	17
2	Fémur	0,017	0,003	0,016	7	19	10	1432	4
3	Tibia	0,039	0,005	0,027	8	35	24	1259	19
4	Diente	0,124	0,019	0,001	7	35	32	9711	19
5	Petroso	0,870	0,014	0,000	62	26	19	6650	14
6	Diente	0,071	0,006	0,087	12	40	32	7507	15
7	Petroso	0,429	0,004	0,378	122	32	22	5708	15
8	Diente	0,077	0,046		2	36	36	7039	21
9	Petroso	0,664	0,018	0,001	38	31	20	6013	17
10	Diente	0,008	0,000		69	6	0	114	0
11	Petroso	0,001		0,000		1	0	74	0
12	Diente	0,091	0,014	0,085	7	38	28	2118	19
13	Petroso	1,650	0,031	1,468	53	34	24	7975	17
14	Diente	0,116	0,020	0,115	6	37	31	2341	19
15	Petroso	0,628	0,007	0,508	89	35	25	4946	17
16	Fémur	0,006	0,000		20	19	5	318	8
17	Tibia	0,053	0,006		9	36	24	1385	18
18	Fémur	0,027	0,003		9	34	27	1420	17
19	Tibia	0,016	0,000	0,014	34	24	8	561	12
20	Diente	0,113	0,018	0,115	6	36	32	4509	18
21	Fémur	0,027	0,007	0,025	4	33	20	1134	17
22	Tibia	0,017	0,001	0,012	14	22	9	479	10
23	Petroso	0,741	0,024	0,631	31	32	24	7927	16
24	Fémur	0,012	0,004	0,011	3	26	14	545	9
25	Tibia	0,008	0,002	0,007	5	20	7	392	5
26	Petroso	0,541	0,003	0,469	173	27	21	6728	11
27	Fémur	0,005	0,000	0,008	12	15	3	191	2
28	Tibia	0,006	0,001	0,006	5	16	2	201	6
29	Diente	0,048	0,012	0,055	4	37	34	2280	20
30	Petroso	0,044	0,004	0,045	11	36	13	655	16
31	Fémur	0,013	0,004	0,013	3	29	9	355	4
32	Tibia	0,008	0,000	0,006	18	19	6	297	8
33	Diente	0,134	0,031	0,111	4	37	35	5492	21
34	Fémur	0,007	0,002	0,006	5	11	2	213	2
35	Tibia	0,005	0,001	0,006	4	18	5	231	8
36	Petroso	0,525	0,015	0,463	36	35	23	6361	16
37	Fémur	0,006	0,000	0,007	13	12	2	257	3
38	Tibia	0,011	0,001	0,007	10	29	4	276	4
39	Diente	0,018	0,002	0,018	8	34	12	551	17
40	Petroso	1,425	0,107	1,193	13	28	21	6550	16
41	Fémur	0,057	0,012	0,046	5	40	35	2407	16
42	Tibia	0,278	0,093	0,192	3	39	39	8690	21
43	Diente	0,024	0,004	0,014	6	37	16	644	9
44	Petroso	0,544	0,002	0,310	237	24	16	4090	11
45	Fémur	0,001	0,000	0,002	5	23	1	135	0
46	Tibia	0,004	0,001	0,003	3	0	0	0	0
47	Diente	0,048	0,006	0,042	8	39	26	1607	15
48	Petroso	0,289	0,004	0,229	78	37	20	2877	16
49	Diente	0,006	0,000	0,006	29	14	114	141	4
50	Petroso	0,616	0,012	0,000	53	25	20	6776	12
51	Diente	0,000	0,000		6	4	0	91	0
52	Petroso	0,119	0,001	0,092	188	21	9	1278	6
53	Diente	0,012	0,001		11	31	9	416	10
54	Petroso	0,385	0,003		127	25	18	5802	11
55	Diente	0,002	0,000	0,002	15	22	0	124	7
56	Petroso	0,203	0,001	0,203	197	28	18	4538	14
57	Diente	0,015	0,002	0,018	6	26	6	297	10
58	Petroso	0,455	0,002	0,400	187	22	15	4545	12
59	Diente	0,027	0,001	0,025	28	29	11	630	12
60	Petroso	0,460	0,006	0,418	75	32	22	4447	18
61	Diente	0,069	0,006	0,068	12	36	28	2448	19
62	Petroso	0,277	0,002	0,283	111	22	15	2644	12
63	Diente	0,003	0,001	0,001	2	11	0	142	3
64	Petroso	0,646	0,006	0,616	108	22	15	3553	12

10. Anexo. Datos suplementarios

65	Diente	0,100	0,015	0,079	6	39	26	1564	4
66	Petroso	1,054	0,032	0,970	33	30	23	5829	16
67	Diente	0,004	0,003	0,000	2	39	19	353	16
68	Petroso	0,371	0,005	0,364	79	30	18	3933	16
69	Fémur	0,007	0,001	0,008	8	16	5	281	6
70	Petroso	0,260	0,001	0,236	360	18	9	1646	8
71	Fémur	0,021	0,003	0,016	6	26	6	364	12
72	Petroso	1,067	0,030	0,730	35	34	23	6121	17
73	Fémur	0,054	0,012	0,052	4	35	23	1161	17
74	Petroso	1,446	0,079	1,338	18	36	27	6735	19
75	Fémur	0,042	0,007	0,054	6	28	15	899	12
76	Petroso	0,752	0,069	0,805	11	32	23	5065	15
77	Fémur	0,038	0,003	0,037	12	27	12	900	13
78	Petroso	0,856	0,055	0,747	16	29	18	4410	16
79	Fémur	0,026	0,003	0,024	9	24	16	807	12
80	Petroso	0,934	0,033	0,795	28	36	28	7918	21
81	Fémur	0,002	0,000		7	6	0	128	2
82	Petroso	1,181	0,068	0,000	17	28	22	8061	17
83	Fémur	0,049	0,009	0,040	5	33	15	974	18
84	Petroso	0,714	0,022	0,537	32	30	18	4174	17
85	Fémur	0,012	0,003	0,013	5	26	12	504	12
86	Petroso	1,824	0,176	1,896	10	37	44	9751	20
87	Petroso	0,866	0,057	0,743	15	37	32	8058	20
88	Fémur	0,033	0,007	0,036	4	28	19	1189	15

Capítulo 2. Preparación de la muestra y extracción de ADN



Las cosas pequeñas son infinitamente las más importantes.

Sherlock Holmes, Un caso de identidad



Resumen: El presente capítulo tiene el objetivo de revisar las diferentes técnicas utilizadas para el pretratamiento y extracción de ADN de muestras de restos óseos degradados para, a continuación, mostrar los resultados obtenidos en una comparativa realizada con una muestra de 25 restos óseos. Cinco protocolos de extracción (extracción orgánica con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, sílice en suspensión, sílice en columnas High Pure Nucleic Acid Large Volume (Roche), el kit comercial InnoXtract™ Bone (InnoGenomics) y PrepFiler™ BTA en un robot AutoMate™ Express (ThermoFisher). A través del análisis de parámetros de cuantificación y de amplificación se obtuvo que el protocolo de extracción orgánica es el método que obtiene mejores resultados, mientras que las columnas de Roche ganan en eficiencia.

Palabras clave: ADN degradado; Extracción de ADN; Pretratamiento; Restos humanos; Restos óseos

Abstract: This chapter aims to review the different techniques used for the pretreatment and extraction of DNA from degraded bone samples. Subsequently, the results obtained from a comparison involving a sample of 25 bone remains are presented. Five extraction protocols were used: organic extraction with phenol/chloroform/isoamyl alcohol, silica in suspension, silica in High Pure Nucleic Acid Large Volume columns (Roche), the commercial kit InnoXtract™ Bone (InnoGenomics), and PrepFiler™ BTA on an AutoMate™ Express robot (ThermoFisher). Through the analysis of quantification and amplification parameters, it was determined that the organic extraction protocol is the method that yields the best results, while the Roche columns excel in efficiency.

Keywords: DNA degradation; DNA extraction; Human remains; Pretreatment; Skeletal remains

1. Introducción.

El ADN que pudiera haber en el resto óseo antiguo, en mayor o menor medida, va a estar siempre degradado. A esto se añade que la mayoría de los especímenes no provienen de ambientes estériles, sino de ambientes naturales como suelos que introducen en las muestras contaminación. Son tres los peligros que surgen en esta etapa analítica: la introducción de ADN moderno, la presencia de muy pocas moléculas de ADN que sirvan como moldes para la PCR, y la copurificación de sustancias inhibitoras que den lugar a falsos negativos. Es por ello que la extracción de ADN antiguo tiene tres requisitos: un pretratamiento de las muestras que reduzca la contaminación de las mismas, la utilización de técnicas de extracción que no dañen el ADN, y que dichas técnicas tengan un alto poder de purificación para poder reducir o eliminar la presencia de inhibidores [1].

De las diferentes etapas que componen el análisis de ADN, es la extracción la más importante, pues va a determinar todo el proceso: sin ADN suficiente de partida no hay amplificación, y por tanto no hay resultados. Es por ello que la clave estará en obtener la mayor cantidad de ADN posible, para lo que el protocolo de extracción va a ser clave. Las moléculas de material genético tienen que separarse del resto de materiales celulares antes de poder ser examinadas, pues las proteínas celulares que empaquetan y protegen el ADN pueden inhibir el análisis [2]. El otro gran problema que presentan los restos óseos en particular es la presencia de inhibidores, cuya presencia deberá ser eliminada o atenuada [3], pues o bien inactivan la ADN polimerasa o compiten con otros componentes de la reacción de síntesis de ADN, por lo que habrá que tener en cuenta la presencia de sustancias extrínsecas del hueso como los ácidos húmicos y fúlvicos del suelo, o bien del propio hueso como el calcio [4].

2. El laboratorio de muestras mínimas.

Una de las piedras angulares del análisis de ADN antiguo es la adopción de medidas para evitar la contaminación, que además mejoran la reproducibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios forenses y de ADN antiguo, medidas como son el top 10 de Poinar [5]:

- 1) *Área de trabajo físicamente aislada.* Para evitar contaminaciones es esencial que todo el trabajo se lleve a cabo en un laboratorio aislado y dedicado exclusivamente a trabajar con muestras degradadas o mínimas. Una construcción separada, si es posible en la que no se lleve a cabo trabajos de Genética, sería la mejor solución, trasladándose el trabajo posterior a la extracción al laboratorio habitual, en el que se llevarán a cabo el resto de etapas de análisis.
- 2) *Control de amplificación.* Es bueno hacer controles del ambiente del laboratorio mediante PCR, esto es cada cierto tiempo hacer amplificaciones (unas 20) de los reactivos con agua. De esta manera el laboratorio tiene un registro de los niveles de contaminación en diferentes

puntos. Naturalmente, también deben introducirse controles de extracción y de amplificación junto con las muestras para detectar contaminación esporádica o de bajo número de copias. Los resultados que presenten contaminación deben ser registrados, y se deben evitar los controles positivos por suponer un riesgo de contaminación.

- 3) *Comportamiento molecular.* La mayoría de las muestras forenses y de ADN antiguo presentan su ADN dañado por hidrólisis, oxidación o entrecruzamiento con proteínas, lo que restringe la amplificación de productos de PCR mayores de 1000 pares de bases. En consecuencia, la amplificación será inversamente proporcional al tamaño del producto de amplificación.
- 4) *Cuantificación.* El número de copias de ADN extraído debe ser estimado por PCR a tiempo real o competitiva, y si el número de copias obtenido en la extracción es bajo (menor de 1000), puede ser imposible excluir la posibilidad de contaminación esporádica. Los niveles de contaminación pueden variar drásticamente, tanto en las muestras como en los reactivos de extracción y amplificación.
- 5) *Reproducibilidad.* Los resultados deben poder repetirse sobre el mismo o distintos extractos de ADN del mismo espécimen.
- 6) *Clonación.* La secuenciación de los productos de PCR se debe comprobar mediante la clonación de los productos de amplificación y su posterior secuenciación para determinar la ratio de secuencias exógenas y endógenas, así como el error inducido por la degradación del ADN.
- 7) *Replicación.* Implica la extracción, amplificación y secuenciación de muestras separadas por distintos laboratorios, especialmente cuando aparecen resultados inesperados.
- 8) *Preservación bioquímica.* Se puede establecer indirectamente la supervivencia del ADN en una muestra si se determina la cantidad total, composición y alteración de aminoácidos y otros residuos. En el caso de muestras forenses, en las que los residuos proteicos presumiblemente estén en buen estado, sería adecuado observar otros indicadores la oxidación de ácidos grasos o la peroxidación lipídica.
- 9) *Restos asociados.* En estudios con restos humanos, en los que la contaminación es especialmente problemática, el estudio de la degradación del ADN de restos de fauna asociados al cadáver da una evidencia muy buena del grado de degradación esperado en el ADN del mismo, así como un control negativo excelente.
- 10) *Sentido filogenético.* Las secuencias obtenidas se deben relacionar con un árbol filogenético con otros haplotipos conocidos para asegurar su autenticidad, especialmente en los estudios de pseudogenes mitocondriales en ADN nuclear.

Adicionalmente, para mayor seguridad, el laboratorio de extracción de ADN de muestras mínimas puede contar con presión positiva (flujo de presión de aire desde el interior) y filtros

HEPA (High Efficiency Particulate Air), además de luz ultravioleta para la descontaminación de superficies, tubos, soportes, pipetas y reactivos [6]. Precauciones similares pueden verse en la Guía de Prevención y Detección de Contaminación para Laboratorios de ADN Forense de la SWGDAM (*Scientific Working Group DNA Analysis Method*) [7].

El objetivo final de todas estas precauciones es evitar tanto la generación de falsos positivos como de falsos negativos, que van a venir de la mano de las siguientes circunstancias [1]:

- *Contaminación y falsos positivos.* Hay diversas estrategias disponibles para prevenir la contaminación: separación de las áreas de pre y post PCR del laboratorio para prevenir el intercambio de productos de PCR; descontaminación de las muestras para eliminar la presencia de ADN moderno; y separación de las muestras y no tocarlas nunca sin guantes para evitar la contaminación cruzada.
- *Inhibidores y falsos negativos.* Las sustancias presentes en el lugar en el que fueron depositados los restos, la presencia de bacterias y hongos en los ambientes de enterramiento o donde hayan sido depositadas las muestras, o la elevada concentración de sales de los reactivos de extracción pueden inhibir la *Taq* polimerasa. Incluso los fragmentos de ADN degradado pueden competir en la PCR. Para estos problemas disponemos de técnicas sencillas, pero muy efectivas: la introducción de controles positivos y la purificación de las muestras después de la extracción de ADN.

3. Pretratamiento de las muestras.

Hay varios métodos disponibles para eliminar o mitigar la contaminación previos a la extracción, como son: el lavado superficial, el lijado, extracción de únicamente el interior del resto óseo, lavado de la muestra con ácido, irradiación con luz ultravioleta, lavado con etanol a alta concentración, lavado con lejía (hipoclorito de sodio), lavado con peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), y la combinación de técnicas [8].

3.1. Lavado de la superficie.

Un lavado vigoroso de la superficie puede eliminar la capa externa de material exógeno del hueso [9], estando descrita para ello el uso de agua esterilizada antes del corte [10], o bien el enjuagado de las piezas cortadas de los mismos en agua destilada varias veces para finalmente dejarlos secar al aire [11].

3.2. Lavado con lejía.

El lavado de la superficie de los restos óseos con lejía, o incluso del pulverizado, es uno de los métodos más comunes para eliminar el ADN contaminante en la investigación, tanto forense como de ADN antiguo, viéndose que, si bien reduce significativamente el ADN humano exógeno, también produce pérdidas de ADN endógeno [12]. El hipoclorito de sodio, componente activo de

la lejía, ataque los ácidos nucleicos muy rápidamente y de forma no específica, degradando bases púricas y pirimidínicas a través de reacciones de oxidación como la cloración [13]. El protocolo para el pulverizado sería el siguiente [14]:

- 1) Añadir 1 ml de lejía 0,5% al polvo de hueso, mantener en agitación 15 minutos, centrifugar 3 minutos a máxima velocidad y evacuar el sobrenadante. Si se observa que a esta concentración no es suficiente, se puede usar lejía más concentrada hasta un máximo del 6%.
- 2) Añadir 1 ml de agua destilada ultrapura, mantener en agitación 3 minutos, centrifugar 3 minutos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante. Repetir para hacer un total de tres lavados.

Alternativamente, se han utilizado también baños en lejía del resto óseo sin pulverizar durante 30 minutos [15].

Dada la naturaleza destructiva de la lejía, se ha explorado la posibilidad de su sustitución mediante otros compuestos como el tampón fosfato para liberar el ADN superficial de las muestras. Este método se basa en la competición entre los iones de fosfato libre y los grupos fosfato de ADN unidos a la hidroxiapatita. Este método resultó menos agresivo con el ADN endógeno, y aunque tiene poder de eliminar el ADN microbiano, su eficacia con el ADN humano exógeno es menor que en el caso de la lejía [12]. El protocolo en este caso sería el siguiente para el pulverizado de hueso [14]:

- 1) Añadir 1 ml de buffer fosfato (fosfato sódico 0,5 M a pH 7,0 y 0,1% polisorbato 20), agitar 15 min, centrifugar 3 min a máxima velocidad. Repetir hasta hacer tres lavados en total.
- 2) Añadir 1 ml de buffer TT (Tri-HCL 10mM a pH 8,0, 0,1% polisorbato 20), agitar, centrifugar 3 min a máxima velocidad, retirar el sobrenadante y continuar con la extracción.

3.3. Lavado con ácido.

De una forma similar a los lavados con lejía o etanol puede observarse en la bibliografía la utilización de ácidos débiles para la eliminación del ADN exógeno de las muestras, como es el caso del ácido acético al 30% en agua ultrapura [16]. El mecanismo de acción de esta técnica se basa en el poder de desnaturalización de un nivel bajo de pH, que hidroliza los enlaces glucosídicos y fosfodiéster del ADN, si bien su eficacia es menor si el mismo es rico en guanina y citosina [17].

3.4. Lavado con etanol.

Otra opción es limpiar los especímenes con un hisopo de algodón estéril que ha sido humedecido con una solución de etanol al 95% en agua destilada [18], o también al 70% [19]. Si bien el etanol no tiene ninguna actividad degradativa sobre el ADN, su utilización para precipitar el ADN es

bien conocida, y su utilidad para la limpieza de superficies en los laboratorios forenses está bien aceptada [20].

3.5. Lavado con peróxido de hidrógeno.

Sumergir los restos óseos en una solución al 3% de agua oxigenada [15] (peróxido de hidrógeno, H₂O₂) o al 3-30% durante 10-30 minutos [10] se ha mostrado también como un método eficaz para eliminar el componente exógeno de las muestras. El fundamento de la utilización de este reactivo es su descomposición en agua y oxígeno libre, que provoca lesiones oxidativas en el ADN por mecanismos iónicos y radicales [21].

3.6. Predigestión enzimática.

Dado que el principal problema de los métodos químicos de descontaminación es que atacan también a la porción de ADN endógeno de las muestras, un método menos agresivo es la predigestión de las muestras con buffer de lisis de EDTA, que reduce significativamente el ADN contaminante sin afectar al material genético endógeno de la muestra [22]:

- 1) Añadir 4 ml de buffer (EDTA 0,45 M a pH 8, 0,25 mg/ml proteinasa K) sobre el polvo de hueso y agitar.
- 2) Incubar en agitación a 50°C durante 15-30 minutos, dependiendo de la cantidad de muestra.
- 3) Centrifugar 3 min a máxima velocidad y retirar el sobrenadante.

3.7. Lijado.

La técnica de pretratamiento de lijado de la superficie del resto óseo consiste en la aplicación de abrasión mecánica sobre su parte más externa, con el fin de eliminar el material exógeno que pueda haber en la misma. Para este respecto se han utilizado diferentes aproximaciones, como la abrasión con óxido de aluminio de 100 µ con unidades de abrasión por aire hasta que se ha eliminado el tejido más oscurecido [23], discos de lija [24], raspado con bisturí esterilizado [25], o el cada vez más extendido uso de herramientas rotativas de precisión como son las Dremel® [26].

El principal problema que presenta el lijado es la formación de polvo de hueso, que puede contaminar tanto la superficie de trabajo como las herramientas de trabajo, otras muestras de restos óseos o incluso el operario. Para mitigar estos problemas el Laboratorio de Identificación Genética desarrolló el lijado de la superficie del hueso en una urna de metacrilato (**Figura 1**) con tapa extraíble, que dispone de un papel de filtro en su fondo, dos huecos laterales para la introducción de los brazos y la Dremel®, así como otro al que va conectado una pequeña aspiradora que elimina el polvo de hueso, siendo toda la operación realizada en una campana de extracción de gases [27]. Esta cabina no sólo evita que se obstruyan los filtros de las cabinas de flujo laminar o de extracción de gases empleadas en la preparación de la muestra, facilitando además la limpieza de todo el equipamiento. De esta manera, en la misma operación puede lijarse

tanto la superficie externa como la interna del hueso, procediéndose a continuación a su corte en fragmentos de 0,5-1 cm².

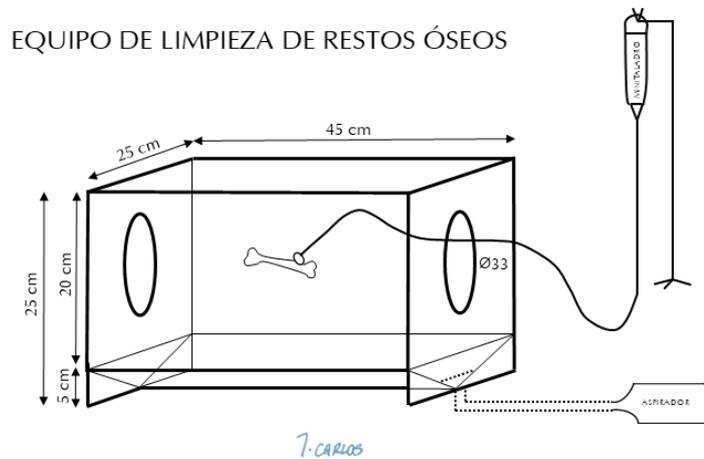


Figura 1. Urna de metacrilato para limpieza y fragmentación del resto óseo [27]

3.8. Extracción del interior del resto óseo.

Para minimizar el riesgo de contaminación con ADN moderno, puede cortarse del hueso una sección de 2x2 cm de hueso compacto de huesos largos, como es el caso de la diáfisis media posterior del fémur, raspando a continuación las superficies interna y externa con un bisturí [28]. De esta manera nos quedaríamos únicamente con la parte más interna del hueso compacto, exenta o expuesta en menor medida a contaminaciones.

3.9. Irradiación con luz ultravioleta.

La luz ultravioleta de onda corta (254 nm) induce el enlace covalente de las bases de timinas opuestas, lo que previene que las dobles cadenas de ADN se separen, por lo que no es accesible para la polimerasa en la amplificación. Es por ello que la exposición de las muestras durante unos pocos minutos a la luz UV resulta útil para la eliminación de ADN exógeno [1].

A este respecto podemos encontrar variaciones en el tiempo de exposición de los restos óseos debido a que el analista debe jugar con el tiempo necesario para afectar al ADN exógeno, pero no al ADN endógeno contenido en la muestra, pudiendo ser de 10 minutos [29], 30 minutos [24], o incluso dos días [30], siendo no obstante 10 minutos el tiempo de exposición más frecuentemente utilizado, por ambas caras de los fragmentos de hueso.

3.10. Combinación de técnicas.

Muchos laboratorios optan por una combinación de dos o más de las técnicas anteriores para la eliminación de ADN exógeno, siendo el lijado de la superficie, el prelavado del pulverizado con lejía y la irradiación de los fragmentos cortados con luz ultravioleta las opciones más utilizadas [8], como se muestra en la **Figura 2**.

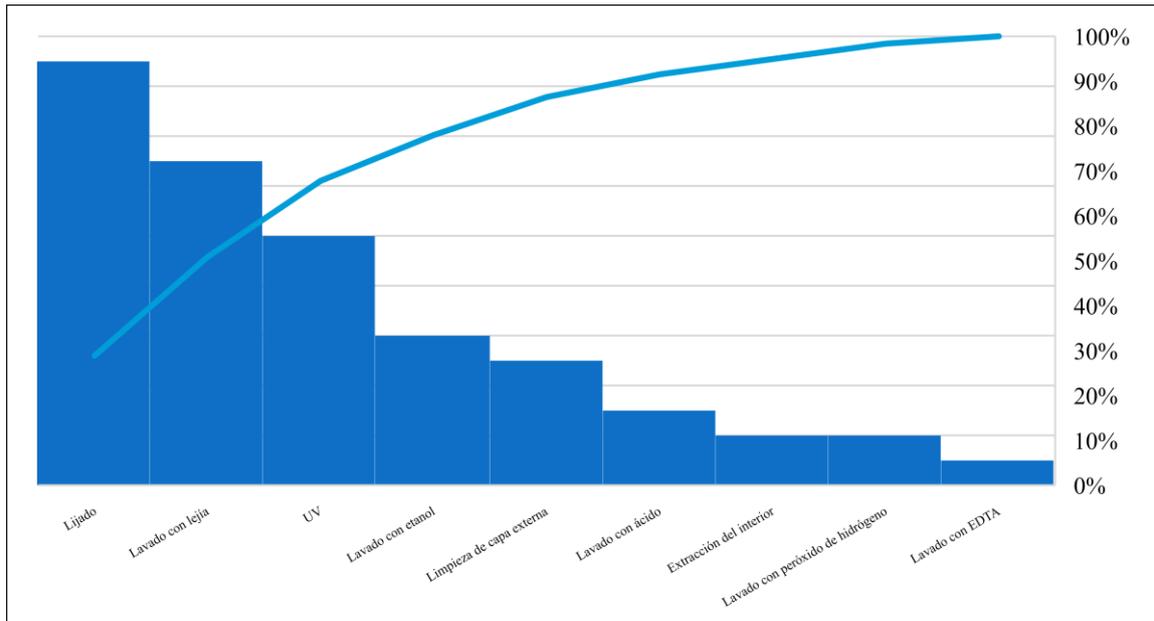


Figura 2. Técnicas de eliminación de ADN exógeno de la muestra de restos óseos [8]

4. Pulverización

A diferencia de otras muestras biológicas como la sangre o la saliva, la matriz ósea es sólida, por lo que el pulverizado de las muestras de restos óseos es un paso necesario en el análisis, pues tiene el objetivo de aumentar al máximo la superficie de contacto entre la matriz ósea y los reactivos del buffer de lisis de manera que se libere el máximo posible de ADN que pueda estar contenido en las muestras. A este respecto hay disponibles diversas alternativas, entre las que cabe destacar tres: la utilización de un mortero, trituradores criogénicos como el Freezer/Mill® y trituradores no criogénicos como TissueLyser.

Las evaluaciones de los diferentes métodos son escasas, aunque se ha visto que ninguno de ellos favorece directamente la obtención de más ADN o su mejor preservación, si bien es cierto que ese es uno de los aspectos a valorar, pues también debe contemplarse que el ADN no se degrade ni se introduzca contaminación en las muestras [31]. También es cierto que los métodos que emplean un equipo de triturado pulverizan más finamente el resto óseo que el mortero, lo que se traduce en un aumento del rendimiento en la extracción [32].

4.1. Mortero

El mortero es de las herramientas más antiguas utilizadas por el ser humano, y ha sido también utilizada en análisis de ADN antiguo para pulverizar las muestras [33], de materiales como cerámica [34], previamente esterilizados mano y mortero [35] con el fin de evitar la contaminación cruzada de muestras. Se han propuesto diseños alternativos de mortero, de acero inoxidable, que suponen una alternativa económica a la utilización de trituradores [36].

4.2. Freezer/Mill (SPEX™SamplePrep LLC, Methucen, NJ)

Los métodos tradicionales de triturado de las muestras de restos óseos tienen el inconveniente de que calientan las mismas, es por ello que se han desarrollado trituradores criogénicos que utilizan nitrógeno líquido para enfriar la muestra durante el pulverizado, lo que ayuda en la obtención de la máxima cantidad y calidad de ADN posible. Hay varios modelos de Freezer/Mill disponibles (6770, 6870, 6870D, 6970EFM), pero todos tienen en común el uso de nitrógeno líquido, permitiendo el último modelo hasta 8 muestras simultáneas [31]. El dispositivo consiste en un vial en el que se coloca la muestra a pulverizar y unas barras metálicas, que triturarán la muestra cuando se agite el vial, el cual se encuentra inmerso en nitrógeno líquido. Se ha visto que estos equipos permiten obtener un pulverizado más fino [37].

4.3. TissueLyser (QIAGEN, Hilden, Alemania)

La necesidad de disponer de nitrógeno líquido en el laboratorio puede ser una fuerte desventaja de los equipos anteriormente vistos, por lo que una alternativa interesante es el dispositivo TissueLyser de Qiagen [38]. Las muestras se colocan en un vial junto con esferas metálicas, consiguiéndose un pulverizado homogéneo mediante la capacidad de vibración de los brazos de la máquina, de 3 a 30 Hz, de 10 segundos a 99 minutos [39]. Esta es la alternativa seguida por nuestro laboratorio, consiguiendo un pulverizado fino en 1-2 run de 30 segundos a 30 Hz, consiguiendo así que la muestra no acumule calor.

5. Extracción de ADN

Como se veía más arriba, la extracción de ADN probablemente sea el paso más importante en el análisis de ADN antiguo, pues nos va a permitir obtener la arcilla de la que podremos (o no) hacer ladrillos posteriormente, y es que el objetivo de esta etapa es obtener la máxima cantidad posible de ADN, y de la mejor calidad que se pueda (esto es, que presente el menor grado de degradación posible) con el fin de poder hacer la amplificación y, finalmente, obtener un perfil que poder comparar.

Hay multitud de métodos disponibles (véase la **Tabla 1**) que pasaremos a desarrollar a continuación. A caballo entre los métodos de pretratamiento y los de extracción propiamente dichos se encuentra un método no destructivo desarrollado por Hofreiter para especímenes de gran valor como las piezas de museo [40], en el que los restos óseos son sumergidos en buffer de extracción, que se purifica posteriormente con sílica.

Tabla 1. Resumen de los métodos de extracción, sus ventajas e inconvenientes, modificado de Barrio-Caballero [3].

	Desmineralización total	Fenol-cloroformo	Chelex-100	Sílica en suspensión	Desmineralización-sílica	Fishing
Ventajas	Escasa pérdida de ADN.	Mayor rendimiento. Elimina inhibidores orgánicos Estandarizado	Simple. En un mismo tubo. No contaminante.	Mayor rendimiento. Elimina inhibidores. Automatización.	Mayor rendimiento. Elimina inhibidores. Gran número de muestras.	Elimina inhibidores. Rápido y sencillo. Gran número de muestras. Automatización.
Inconvenientes	Largo. Laborioso.	Los inhibidores no se eliminan completamente. Disolvente muy tóxico. Protocolo largo.	No elimina inhibidores. Rendimiento menor.	Largo. Complejo.	Riesgo de contaminación cruzada. No validado.	Menor rendimiento. Coste elevado.

5.1. Desmineralización total

Este método se desarrolló en 1991 con huesos de animal y ser humano bien preservados procedentes de excavaciones arqueológicas, utilizando EDTA 0,5M (ácido etilendiaminotetraacético), proteinasa K y N-lauroilsarcosina a 37°C durante 18-24 horas, seguido de una extracción con fenol-cloroformo. La descalcificación del hueso también es posible sumergiendo los cortes de hueso en EDTA durante 72 horas, si bien esta aproximación reduce el rendimiento [41]. La base de este método es la capacidad quelante del EDTA, que se une a los iones de calcio y hierro. El problema de rendimiento de esta técnica (en la que el EDTA sobrenadante se retira para añadir posteriormente el buffer de lisis) se soluciona haciendo que el EDTA forme parte del buffer de lisis, de manera que el ADN pueda ser posteriormente purificado con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 después de una lisis overnight, para finalmente concentrar las muestras mediante su centrifugación con filtros [42]. Un protocolo híbrido entre estos dos es la incubación de 0,6-1,2 g de polvo de hueso en 15 ml de EDTA 0,5M, lauril-sarcosinato al 1% y proteinasa K a 20 mg/ml, seguido de una extracción con fenol-cloroformo, filtración y dos lavados con agua destilada [43].

El método de desmineralización total ofrece diversas ventajas, como la minimización de pérdida de ADN en el polvo residual al disolver el polvo de hueso completamente, al mismo tiempo que la disolución completa del pulverizado permite la liberación del ADN embebido en los agregados cristalinos de la matriz ósea [37].

5.2. Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

También en 1991 se desarrolló el bien conocido método de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (**Figura 3**). Por este método se toman 5 g de polvo de hueso, que se descalcifican con EDTA 0,5M durante 3-5 días, para a continuación lavar el pellet tres veces con agua ultrapura, lisarlo con proteinasa K y buffer de extracción durante 2 horas, se extrae tres veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se concentra y purifica con centrifugación en filtros

Centricon [44]. La mezcla normalmente contiene Tris-EDTA 10mM, que actúa como estabilizante, siendo las proteínas desnaturalizadas mediante la acción del fenol, cuyo rendimiento es aumentado por la acción del cloroformo, que también desnaturaliza los lípidos, al tiempo que el alcohol isoamílico estabiliza la interfase y aumenta la pureza del ADN, que queda atrapado en la fase acuosa.

Versiónes modificadas de este protocolo introducen SDS y DTT en el buffer de lisis [45]. El SDS (sodio dodecil sulfato) es un detergente aniónico que linealiza las proteínas presentes en la cromatina, mientras que el DTT (ditiotreitól) es un agente reductor que reduce los puentes disulfuro presentes en las proteínas.

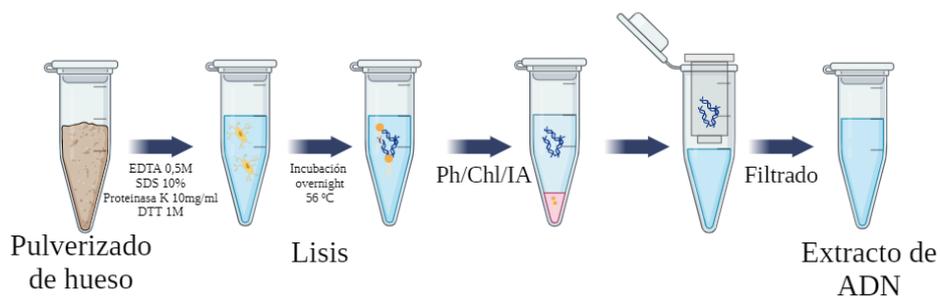


Figura 3. Esquema del protocolo de extracción orgánica. Editado con Biorender

El principal inconveniente de la extracción orgánica es que el fenol/cloroformo/alcohol isoamílico es un reactivo peligroso, tanto para el medio ambiente como para el analista, de modo que tiene que ser utilizado en una campana de extracción de gases, al tiempo que los residuos generados en su utilización deben ser gestionados correctamente. No obstante, este método es conocido por tener un alto rendimiento, a pesar de ser laborioso.

5.3. Resina Chelex®

Este protocolo (**Figura 4**) utiliza una resina quelante de iones, siendo simple, ejecutándose en el mismo tubo y con un número de pasos mínimo, sugerido en 1998 con la resina Chelex®-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), compuesta por copolímeros de estireno divinilbenzeno e iones de iminodiacetato que se unen a los iones metálicos polivalentes, de manera que las muestras se calientan en una suspensión al 5% de Chelex®-100 [46], recomendándose una incubación de 30 min a 56°C en el caso de restos óseos. Se ha desarrollado un protocolo específico para ADN antiguo mediante una incubación inicial de 3 horas a 56°C de 100 mg de polvo de hueso, seguido de 20 min de calentamiento [47]. Se puede añadir proteinasa K previamente a la incubación para obtener un mayor rendimiento [48]. A pesar de ser un método rápido y no perjudicial para el medio ambiente o el operario, la resina no tiene capacidad para eliminar inhibidores, por lo que será necesaria una purificación posterior.

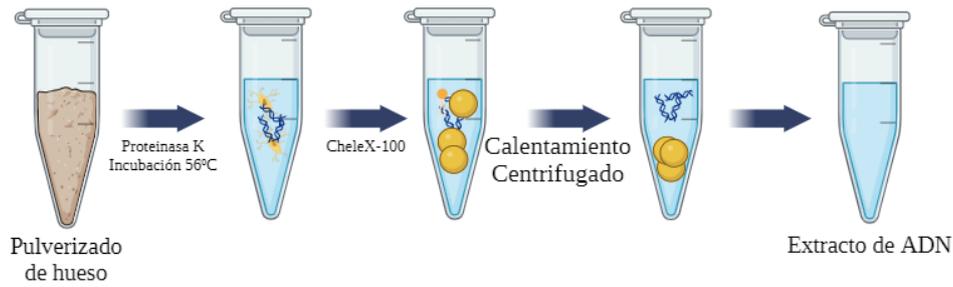


Figura 4. Esquema del protocolo de Chelex®-100 en restos óseos. Editado con Biorender

5.4. Tiocianato de guanidinio (GuSCN) y sílica

Cuando el resto de métodos de extracción de ADN fallaban en unos restos óseos del Pleistoceno, se probó a añadir a 500 mg de pulverizado de hueso un buffer de extracción de tiocianato de guanidinio (GuSCN) 10 M, Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,02 M, y Triton X-100 1,3%. Después de la incubación, el sobrenadante se mezclaba con buffer de lisis y una suspensión de sílica, que se lavaba dos veces con buffer de GuSCN, dos veces con etanol al 70% y una con acetona, para finalmente eluir el ADN extraído [49]. Este método, (véase la **Figura 5**), resultó tener éxito en esa y otras muestras donde no era posible obtener ADN con otros protocolos. A diferencia de otros, este método tiene varias ventajas [50]: es rápido y fácil (el extracto se obtiene con dos-tres días de trabajo), adaptable a diversas cantidades de pulverizado (50 mg- 2 g), sencillo de implementar, y elimina eficientemente inhibidores de PCR.

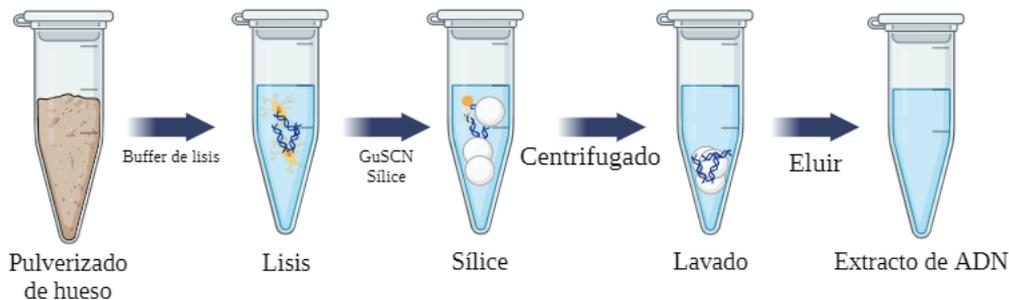


Figura 5. Esquema de la extracción de ADN por el método de sílice. Editado con Biorender

El fundamento de este protocolo es la utilización de dos elementos: sales caotrópicas, aquellas capaces de alterar la estructura tridimensional del agua, y sílica (SiO_2), de manera que una sal caotrópica (como es el GuSCN) en una concentración elevada reduce la cantidad de agua disponible para disolver el ADN, que secuestra 20 moléculas de agua por nucleótido, ocurriendo la adsorción por parte de la sílica, que también está sometida a las mismas interacciones, formándose un complejo ADN neutro-sílica [51]. Es por ello que para eluir el ADN basta con eliminar esta sal y sustituirla por agua o buffer TE.

Aunque se trata de un método laborioso, se han hecho esfuerzos por producir columnas que contienen la sílica y sendos filtros, a través de la cual se hace pasar las muestras tras la lisis [52].

5.5. Desmineralización-sílica

La Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas (International Commission on Missing Persons, ICMP) tiene experiencia en la identificación de restos óseos degradados, mayormente de las guerras yugoslavas de los años 90, consiguiendo identificar en 2007, desde su creación en el año 2000 [53] a más de 11 000 individuos comparando el ADN de los restos óseos con el de familiares que han reportado una desaparición. Utilizan un protocolo modificado (**Figura 6**) basado en QIAamp DNA Blood Maxi kit de QIAGEN (Hilden, Alemania). De 2 a 6 gramos de polvo de hueso se incuban en 15 ml de buffer ATL y 10 mg de proteinasa K y se incuban a 56°C durante 18 h en un baño de agitación, añadiendo posteriormente 14 ml de buffer AL, incubando 1 hora a 70°C. Lo que pueda quedar de polvo de hueso se centrifuga, transfiriéndose el sobrenadante a otro tubo al que se añaden 22 ml de etanol y se transfiere el volumen total a las columnas de QIAGEN para proceder a los lavados con AW1 y AW2. El ADN es finalmente eluido con buffer AE en dos veces [54].

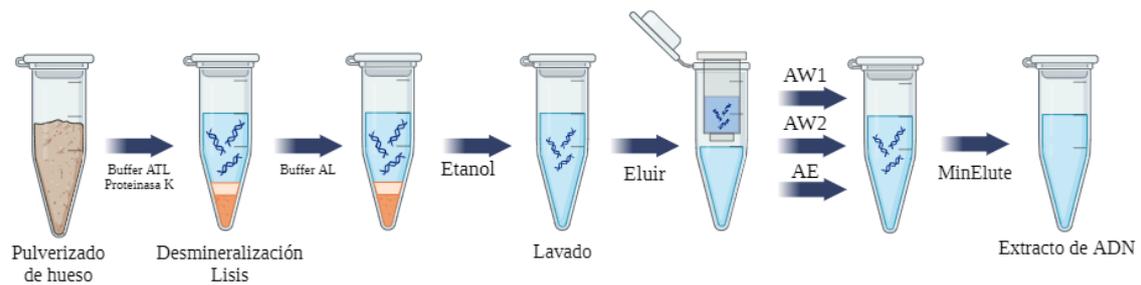


Figura 6. Protocolo de desmineralización-sílica. Editado con Biorender

El volumen de ADN eluido se concentra en columnas de Millipore (Billerica, MA, USA), lavándolo dos veces con agua ultrapura, concentrando el extracto a unos 100 µl con un concentrador a vacío de Eppendorf [55]. Si se observa la presencia de inhibidores en las muestras se recomienda una purificación del extracto final con el kit de purificación de QIAGEN QIAquick PCR purification kit [56].

5.6. Fishing

La mayoría de los kits comerciales de extracción de ADN, que veremos a continuación, están basados en el protocolo de extracción de *fishing* (**Figura 7**), en el que 70 mg de polvo de hueso se extraen con 1 ml de buffer de EDTA 0,5M, SDS 0,5% y proteinasa K a 100 mg/ml, incubados en agitación 24 h a 55 °C. Las muestras se centrifugan y se pasan a un filtro Amicon®, añadiéndose posteriormente 1 ml de buffer de NaCl 1M, Tris-HCl 5mM y EDTA 0,5M al centrifugado, centrifugando una vez para volver a añadir 1 ml de buffer y centrifugar otra vez. Al retenido

restante se añade 1 ml de buffer y 0,05 pmol de primers biotinilado, incubando 15 min a 100 °C y luego 15 min en hielo, para una última incubación 30 min a 50 °C. El ADN se inmoviliza con 0,04 mg de partículas magnéticas cubiertas de estreptavidina, se lava dos veces con el buffer anterior y otras dos veces con buffer Tris-HCl 10mM y KCl 50mM, resuspendiendo al volumen deseado [57].

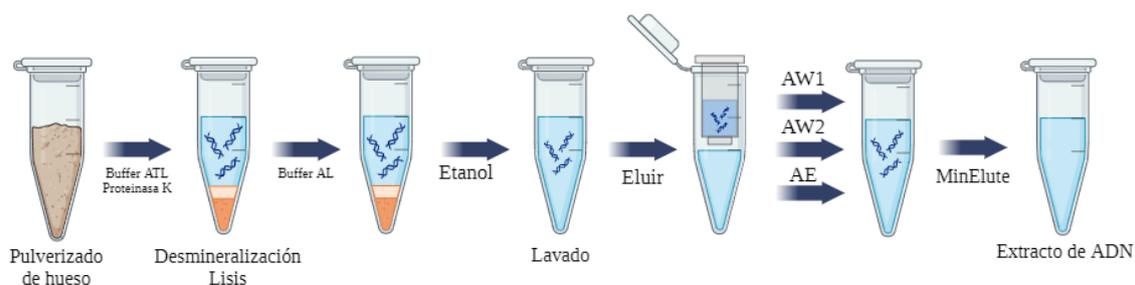


Figura 7. Protocolo de fishing. Editado con Biorender

El fundamento de esta técnica reside en la afinidad de la biotina por la estreptavidina. El ADN está unido a la biotina, y esta a la estreptavidina que recubre las partículas magnéticas, quedando el material genético retenido mientras que impurezas e inhibidores son lavados.

5.7. Kits comerciales de extracción de ADN

Hoy en día hay disponibles muchos kits comerciales para análisis de ADN en restos óseos (Tabla 2), necesitando la mayoría de ellos un pretratamiento mecánico de la muestra. Muchos de ellos pueden ser automatizados con el equipamiento correspondiente, lo que ofrece varias ventajas: se mantiene la integridad de la muestra, aumenta la reproducibilidad, ritmo de trabajo constante, gran flujo de muestras, integración de flujos de trabajo, disponibilidad de ficheros electrónicos de auditoría, compatibilidad con el sistema LIMS, minimización de intercambio de muestras o de errores de entrada de datos, y reducción del tiempo de manipulación de las muestras, así como del estrés por trabajo repetitivo en el analista [58].

Tabla 2. Kits comerciales para extracción de ADN en restos óseos

Kit	Formato	Tiempo de lisis	Tiempo protocolo	Automatización
<i>PrepFiler™ BTA (ThermoFisher)</i>	100 reacciones	2 h	~2-3 h	AutoMate™ Express
<i>Bone DNA Extraction (Promega)</i>	100 reacciones	2,5 h + 2,5 h	~2 h	Maxwell®
<i>QIAamp DNA Investigator (Qiagen)</i>	50 reacciones	Overnight	~30-60 min	QIAcube Connect
<i>EZ1 Investigator (Qiagen)</i>	48 reacciones	24-48h	~20 min	EZ1
<i>Cells and Tissue DNA Isolation (Norgen Biotek)</i>	50 reacciones	2 h	~1 h	No
<i>CrimePrep (Ademtech)</i>	96/48 reacciones	2 h	~1 h	Automag

InnoXtract™ (InnoGenomics)	10/25/50 reacciones	5 h - overnight	~1 h	EZ1
GENECLEAN® Kit for Ancient DNA	10/100 reacciones	12-15 h	4-6 h	FastPrep™ Instruments

PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) se desarrolló para la extracción de ADN de huesos y dientes, así como colillas de cigarrillos, sobres, cintas adhesivas y chicles. El formato del kit es de 100 reacciones, con 2-3 horas de tiempo para el protocolo completo, requiriendo un tiempo de lisis menor en comparación con otros métodos, no siendo necesario el uso de fenol-cloroformo. Libera el ADN de los tejidos calcificados con una secuencia de lavados con diferentes buffers y filtrados con columna, pero el fundamento principal es el uso de partículas magnéticas. El protocolo se divide en cuatro partes: lisis (mediante PrepFiler® BTA Lysis Buffer y DTT), unión del ADN (PrepFiler® Magnetic Beads), purificación (PrepFiler® Wash Buffer) y reconstitución del ADN (PrepFiler® BTA Lysis Buffer). El buffer de lisis está compuesto de ácido tiocianico (HSCN) y guanidina en proporción 1:1, que en el caso del BTA añade hidróxido de sodio a la mezcla. Hay diversas variaciones del protocolo atendiendo a la complejidad de las muestras, desde el incremento de la cantidad de polvo de hueso, y por ende el volumen de reactivos a la elongación del tiempo de lisis a una digestión overnight, a lo que el volumen de elución de ADN puede ajustarse. Este kit puede automatizarse con el robot Automate Express™, con el mismo protocolo, teniendo que hacer una lisis en un thermoshaker para después proceder a la purificación del lisado en el robot, que utiliza cartuchos precargados que reducen la manipulación de las muestras [59].

Bone DNA Extraction Kit (Promega, WI, USA) es la suma de dos protocolos, con un kit de preprocesado y otro de purificación de la muestra. El kit de purificación se desarrolló combinando métodos tradicionales que están bien asentados en los laboratorios de identificación genética, utilizado un buffer de desmineralización con EDTA a 0,5M y sarkosyl al 1% y un protocolo de extracción orgánica con proteinasa K y 1-tioglicerol, con el fin de extraer ADN de la matriz calcificada de manera efectiva y eficiente. El primer paso puede ser continuado manualmente o con el robot de extracción de Promega Maxwell®, en cualquier caso utilizando DNA IQ™ para purificación. El formato es de 100 reacciones y el tiempo estimado de realización es de 7 horas, ya que la desmineralización y la digestión ocupan 2,5h cada una, lo que hace difícil ejecutarlo en una jornada de trabajo [60].

QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) también tiene dos fases: un protocolo de pretratamiento de huesos y dientes que hace la descalcificación y la lisis con EDTA y proteinasa K, y una purificación con las columnas MinElute, cuyo éxito se basa en la capacidad selectiva de unión de una membrana basada en la sílica. La purificación puede automatizarse con el robot QIAcube Connect, presente en muchos laboratorios de identificación genética. En

cualquier caso, QIAGEN ha desarrollado un protocolo similar al de PrepFiler™: el *EZI DNA Investigator Kit*, basado en una fase de lisis manual y una purificación automatizada en el robot EZ1 Advanced. La lisis requiere un paso de descalcificación con EDTA 0.5M (no incluido en el kit), durante 24-48h, y una digestión de 3 h con proteinasa K. El lisado se divide en diferentes alícuotas a las que se añade buffer MTL para posteriormente cargar las muestras en el robot. El protocolo acepta tres cantidades diferentes de pulverizado de resto óseo, utilizando el robot cartuchos precargados que reducen la manipulación de las muestras [61].

Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Ontario, Canadá) purifica el ADN de varios tipos de tejidos utilizando partículas magnéticas, recomendando el fabricante un paso previo de descalcificación para mejorar la eficiencia de la recuperación de ADN. La descalcificación se hace añadiendo al pulverizado EDTA e incubando durante 24 h, para después de varias centrifugaciones utilizar el sobrenadante y 20 mg de muestra. El formato es de 50 reacciones y el tiempo de ejecución es de 60 minutos a los que se añaden 24 horas de incubaciones [62].

Crime Prep Adem-Kits for casework (Ademtech, Pessac, Francia) se basan en partículas magnéticas especialmente diseñadas, con un alto componente magnético y una superficie controlada. El protocolo de Crime Prep empieza con 100 mg de polvo de hueso al que se hacen 2 horas de lisis (se recomienda *overnight*), seguido por diversos lavados para finalmente eluir las muestras. Crime Prep viene formato de 96 muestras, con un tiempo de ejecución a los que se añaden las horas de lisis, pudiendo ser automatizado con el equipo Automag, que trabaja con placas de 12 muestras y con un tiempo de procesado de 40 minutos [63].

InnoXtract (InnoGenomics, New Orleans, LA, USA) se fundamenta igualmente en el uso de partículas magnéticas en un protocolo manual que parte de 40 mg de pulverizado del resto óseo, una lisis de 5 horas a *overnight* y diversos lavados [64].

GENECLEAN™ Kit for Ancient DNA (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), está diseñado para la extracción de ADN de tejidos o muestras de valor histórico o forense, incluyendo hueso, tejidos preservados o productos animales, con reactivos especialmente formulados para la prevención de contaminación con ADN moderno, siendo capaz de aislar hasta 20 µg de ADN. El fundamento químico del mismo radica en el uso de sílice y sales caotrópicas. [65].

Hace unos años se describió un protocolo de extracción de ADN de restos óseos que no requería de pulverizado, combinando el protocolo de fenol/cloroformo con el QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN, cambiando el pulverizado manual por agitación e incubación *overnight*, aunque los resultados no fueron concluyentes debido al bajo número de muestras y a las diferencias de calidad del ADN extraído [66].

Más recientemente, se describió la extracción de ADN de esternón saponificado de un cuerpo recuperado en el mar que no presentaba costillas. El ADN fue extraído usando el kit de Macherey-Nagel (KG, DÜ, Alemania), modificando el protocolo del kit NucleoSpin® DNA Trace Kit, cambiando la cantidad de hueso de partida, el volumen de reacción, las cantidades de proteinasa K y buffer de lisis (B3 buffer del kit NucleoSpin® DNA Trace Bones Buffer Set), modificando también el tipo y número de columnas que se unirían al ADN [67,68]. Del mismo modo se ha descrito un método para restos óseos anegados en agua, con una extracción que combina el protocolo de extracción orgánica con el kit de ThermoFisher, haciendo una digestión con proteinasa K, purificación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y secando la fase acuosa con un SpeedVac®. El pellet seco se reconstituye con agua ultrapura, que será el sustrato para el kit ChargeSwitch® gDNA Plant Kit [69].

Finalmente, los huesos embalsamados tienen el problema añadido de que se conservan en sustancias como glutaraldehído o formalina, que inducen el entrecruzamiento molecular del ADN, por lo que habrá que utilizar técnicas específicas de pulverización, buffer de descalcificación, tratamiento con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y kits comerciales para poder extraer ADN [70].

5.8. Comparación de los diferentes métodos de extracción

De los diversos estudios comparativos de extracción de ADN antiguo destaca el realizado por Rohland y Hofreiter [32] en 8 huesos de oso del Pleistoceno, analizándolos por duplicado son seis métodos diferentes: sílice en suspensión, sílice-NaCl modificado, sílice-GuSCN modificado, fenol/cloroformo, precipitación con etanol y el kit de Qiagen DNeasy® tissue kit. Los tres primeros fueron los que mejor resultados dieron, teniendo los tres un rendimiento similar; no obstante, el método de sílice-GuSCN fue el que mejores resultados de cuantificación arrojó, con diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, los métodos de sílice y sílice-GuSCN modificado fueron los que mejor eliminaban los inhibidores, viéndose finalmente que muchos de los reactivos utilizados rutinariamente en la extracción de ADN antiguo no aportan nada, e incluso empeoran la obtención de ADN, lo que hace necesaria una optimización del protocolo de extracción que se vaya a aplicar con este tipo de muestras. El tipo de muestra también tiene su importancia, observándose que la combinación de sílica en suspensión con el hueso petroso o la cavidad pulpar arrojaban mejores resultados de cuantificación y de secuenciación de ADN mitocondrial que otras muestras con columnas HE o XS o fenol/cloroformo [71].

Un estudio comparó la extracción en 16 muestras de restos óseos de diferente data con tres métodos diferentes: extracción orgánica, desmineralización total y con columnas de sílica de Qiagen Blood maxi kit, no encontrando diferencias significativas entre las dos técnicas que mejor rendimiento presentaron, tanto la orgánica como la sílica. Teniendo en cuenta que la extracción

orgánica es considerablemente más económica, incluso recomiendan los autores su empleo cuando el presupuesto es más ajustado, si bien el kit de Qiagen resultaba mucho menos laborioso [72].

Sobre la importancia de la desmineralización, un estudio realizado en 12 muestras de restos óseos recuperados en ambientes tropicales comparó la extracción con columnas de sílice y un buffer de hidrocloreuro de guanidina (en lugar de tiocianato para la unión del ADN al sílice) con una modificación del mismo método con un lavado inicial con EDTA y un tiempo de incubación mucho mayor para conseguir la total digestión de la matriz ósea, no encontrando diferencias significativas entre los dos métodos en los datos de cuantificación, pero sí en la longitud de los fragmentos observados o la cantidad de ADN endógeno, recuperándose fragmentos más cortos con el método sin desmineralización [73]. De hecho, la extracción con el sobrenadante de la desmineralización (en lugar de desecharlo) y tiempos de desmineralización más cortos han correlacionado con mejores resultados de obtención de ADN [74]. Se ha visto también que la extracción con sílice mejora el análisis de ADN con técnicas de secuenciación masiva si se compara con la desmineralización total, observándose un contenido más informativo de las secuencias con fragmentos de hasta 35 pares de bases, así como un mayor porcentaje de lecturas [75].

El tipo de ambiente concreto en el que se han conservado los restos óseos parece influir también en el éxito en la extracción, en el sentido expuesto por un estudio en el que se comparan la extracción de agregados de cristales de hidroxiapatita aislados con hipoclorito de sodio [76], desmineralización total y fenol/cloroformo, vio que los dos últimos métodos funcionaban mejor en aquellos casos en los que los huesos no estuvieron enterrados [77].

A la hora de hacer una comparativa entre los diversos métodos de extracción de ADN en restos óseos antiguos hay varias variables a tener en cuenta, como son [78]:

- a) *Pulverizado*. El analista juega con dos variables: la finura del polvo de hueso frente al tiempo necesario para obtener ese grado de pulverización, lo que se traduce en una mayor temperatura que alcanzan los restos.
- b) *Cantidad de polvo de hueso*. Hay un rango óptimo que depende del protocolo, estando normalmente situado entre 100 y 500 mg. Utilizar más cantidad de la aconsejada o validez puede incluso llegar a ser contraproducente, reduciendo la cantidad de ADN finalmente obtenida.
- c) *Tiempo de incubación*. Se ha señalado que no se obtiene un mejor rendimiento conforme aumenta el tiempo de lisado de las muestras, por lo que se prefiere, por economía, los tiempos más cortos.

Comparando kits comerciales, un estudio japonés analizó muestras de restos óseos de diferente data (hasta 10 años) utilizando en la extracción QIAamp DNA Mini Kit, PrepFiler Express BTA y fenol/cloroformo, obteniendo más ADN en la cuantificación y mejores resultados de STRs el primer método [79]. No obstante, se ha comprobado en huesos de hasta 43 años un mejor rendimiento de las columnas de la casa comercial Zymo Research (ZR Genomic DNA Tissue MicroPrep kit), que las de Qiagen [80]. Finalmente, una comparativa entre los kits de Qiagen y ThermoFisher (PrepFiler) observó que cuando los huesos están muy degradados se obtienen mejores resultados utilizando la metodología manual del kit de Qiagen [81].

6. Purificación

6.1. Inhibidores de la PCR

Aunque muchos protocolos y kits comerciales contemplan la purificación, hay ocasiones en las que puede ser necesario contemplar este paso debido a la posible presencia de *inhibidores* de la PCR en el extracto de ADN. Y es que puede suceder que tras un arduo trabajo la amplificación de ADN falle, y quizás no se deba al preciado ADN que hemos obtenido, sino a la presencia de estas sustancias en el extracto. De hecho, cuando se empezaba a hacer análisis de ADN antiguo en restos óseos se empezó a ver la problemática de inhibición que presentaban algunas muestras [82]. Se observó una correlación entre la inhibición de las muestras y la presencia de extractos del suelo que las rodeaba cuando estaban enterradas, sugiriéndose que la inhibición venía dada por la coloración marronácea que muchas veces adquiere el extracto de ADN de restos óseos [83].

Son varios los mecanismos químicos que pueden conducir a la inhibición de la reacción en cadena de la polimerasa [84]:

- a) *Alteración de la función de la ADN polimerasa.* La ADN polimerasa puede ser degradada por proteinasas, desnaturalizada por el fenol o detergentes, e inhibida por el bloqueo del sitio de actividad como la unión de un grupo hemo.
- b) *Presencia de iones divalentes.* Iones divalentes como el Ca^{2+} en concentración superior a 3mM tienen actividad inhibidora por competir con el magnesio (que actúa como catalizador) al unirse a la polimerasa. Los iones monovalentes, en menor medida, también muestran acción inhibidora.
- c) *Ácidos húmicos.* Compuestos marronáceos presentes en el suelo, estas sustancias presentan inhibición no competitiva al unirse al complejo enzima-sustrato, dejándolo inactivo. También presentan un alto coeficiente de absorción, causando sobreestimaciones en los ensayos de cuantificación.
- d) *Glicación del ADN.* La reacción del ADN con un azúcar reductor puede conducir a una depurinación que modifica las bases nitrogenadas presentes en la cadena de ADN molde, inhibiendo la PCR.

Concretamente, en el caso de los restos óseos antiguos, son el *colágeno tipo I* y los *productos de Maillard* los principales factores de inhibición intrínsecos a la muestra [24]. La coloración marronácea presente en el extracto de ADN de restos óseos se ha correlacionado fuertemente con inhibición de la PCR, debido probablemente a la presencia de productos de reacciones de Maillard [85]. Llamadas así por su inventor, estas reacciones de envejecimiento bioquímico hacen referencia a reacciones no enzimáticas entre aminas y compuestos carbonilos, especialmente azúcares reductores, produciendo compuestos cuya principal característica es el color marrón [84]. Además, estos compuestos dan fluorescencia azul bajo la luz ultravioleta, por lo que pueden ser confundidos con ácidos nucleicos durante la cuantificación [86]. Por su parte, el colágeno constituye el 90% de la fracción orgánica del hueso, estando formado por cadenas de polipéptidos con capacidad inhibidora [87] por su interacción con la cadena de ADN molde, afectando a la actividad de la ADN polimerasa durante la síntesis [88]. Finalmente, como ya se apuntó más arriba, el calcio presente en el tejido óseo es un potencial inhibidor, lo que hace la desmineralización un paso esencial en la extracción.

6.2. Purificación manual

Hay dos métodos tradicionales de purificación para análisis de ADN antiguo [89]: filtración y columnas con partículas de sílica. El primero de ellos utiliza los filtros Centri-con™ [41], que contienen una membrana anisotrópica que retiene macromoléculas como el ADN, al tiempo que moléculas de bajo peso, como los inhibidores, pasan a través de la misma. Otros protocolos incluyen el lavado con 1 ml de agua ultrapura o 2 ml de buffer TE con Tris 0,01M y EDTA 0,001 M a pH 7,5 [44]. El segundo método utiliza partículas de sílica [49] con una gran capacidad de unión a las moléculas de ADN, que quedan retenidas mientras que los inhibidores son lavados. No obstante, las partículas de sílica son en sí mismas potenciales inhibidores de la PCR, de modo que el pellet de sílica debe ser lavado al menos dos veces con tiocianato de guanidinio (GuSCN) a 10M y buffer Tris-HCl a 0,1M a pH 6,4, otras dos veces con etanol al 70% y una con acetona.

Otra aproximación es precipitar cualquier material no nucleico añadiendo una solución saturada de acetato sódico, lo que se conoce como *salting-out*, añadiendo 1 ml de esta solución al tubo con la muestra, que se agita manualmente durante 30 s para luego ser centrifugado 10 min a 4000 g [90].

6.3. Kits comerciales de purificación

También para la purificación del extracto de ADN hay disponibles diversos kits comerciales, como el DNA IQ™ System Purification de Promega o QIAquick™ PCR Purification Kit de QIAGEN [91]. El primero utiliza la DNA IQ™ Resin, que se añade a la muestra y se resuspende, se deja incubar 5 min y se separa utilizando un soporte magnético. A continuación se hacen lavados con Lysis Buffer y Wash Buffer (tres con cada uno), se deja secar la resina 5 min y se

eluye el ADN al volumen deseado [92]. La segunda combina la tecnología de las columnas con las propiedades de la membrana de sílica, capaces de unirse hasta a 10 µg de ADN gracias a un buffer que proporciona la correcta concentración de sal y pH, ocurriendo la unión del ADN mediante sales caotrópicas que modifican la estructura del agua. Los inhibidores se lavan con diversos buffers y el ADN purificado se eluye en Tris [93].

7. Experimento #2. Comparativa de 5 métodos de extracción de ADN en muestras críticas

El objetivo de este ensayo es identificar el mejor protocolo de extracción para muestras de restos óseos degradadas. Para ello se analizaron 25 restos óseos, cada uno de ellos con 5 métodos de extracción de ADN diferentes. De este capítulo se ha derivado la siguiente publicación en la revista *Forensic Science International*:

Haarkötter, C., Gálvez, X., Vinueza-Espinosa, D. C., Medina-Lozano, M. I., Saiz, M., Lorente, J. A., & Álvarez, J. C. (2023). A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains. En *Forensic Science International* (Vol. 348, p. 111730). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111730>

7.1. Materiales y métodos

Los diferentes procedimientos que a continuación se detallan se llevaron a cabo en un laboratorio de muestras mínimas, siguiendo las recomendaciones internacionales [94,95], incluyendo luz ultravioleta para descontaminación de la sala, presión positiva con unidad de aire con filtro HEPA, controles negativos de extracción, controles positivos y negativos de PCR, material de laboratorio estéril, y cotejo de los perfiles genéticos obtenidos con el personal del laboratorio como medidas de prevención y detección de la contaminación. Los índices de degradación y los perfiles genéticos en forma de pendiente de ski (*ski-slope*) se utilizaron como indicadores de ADN endógeno.

Muestras

Para el estudio se han analizado muestras enterradas durante 70-80 años en la región Suroeste de Andalucía. No se disponen de datos *in situ* de los lugares de enterramiento, pero esta zona se caracteriza por un pH del suelo ligeramente ácido [96], temperaturas altas en verano (28 °C de media con máximas de 45 °C), más de 2500 horas de insolación anuales (con una energía de 5kW/h/m²) y temperaturas mínimas de 12-14 °C en invierno, con unas precipitaciones medias anuales de 400-600 mm concentrados en pocos días de lluvia [97].

Se analizaron 25 muestras de restos óseos (véase la **Tabla 3**) de fosas comunes en Andalucía (España), de la Guerra Civil (1936-1939) y la Posguerra española. Las muestras se lijaron y cortaron con un minitaladro *Dremel*[®], pulverizándose los fragmentos con un equipo *TissueLyser II* (*QIAGEN*, Hilden, Alemania).

Tabla 3. Muestras de restos óseos analizadas

	Húmero	Cúbito	Tibia	Fémur	Petroso	Total
n	1	1	1	10	12	25

Extracción de ADN

Las muestras se extrajeron utilizando cinco métodos de extracción de ADN, que se resumen en la **Tabla 4**: 1) extracción orgánica con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Ph-Chl-IA), 2) sílice en suspensión, 3) sílice en columna del kit *High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit* (Roche, Basel, Suiza), 4) protocolo manual del kit *InnoXtract™ Bone* (InnoGenomics, Nueva Orleans, LA, EE.UU.), y 5) protocolo automatizado del kit *PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit* en un equipo *AutoMate™ Express Nucleic Acid Extraction System* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Tabla 4. Resumen de los diferentes métodos de extracción de ADN probados

Protocolo	Fundamento	Polvo de hueso (mg)	Lisis (h)	Automatizado
Ph-Chl-IA	Extracción orgánica	1000	Toda la noche	No
Sílice en suspensión	Sílice	500	48	No
Sílice en columna	Sílice	150	48	No
InnoXtract™	Partículas magnéticas	3x40	Toda la noche	No
PrepFiler™ BTA	Partículas magnéticas	3x200	Toda la noche	Sí

Extracción orgánica

El ADN se extrajo de 1,0 g de polvo de hueso utilizando un protocolo interno basado en el método tradicional de extracción de ADN con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [44]. El polvo de hueso fue digerido a 56°C con 5 ml de tampón de lisis (4125 µl de EDTA 0,5M, 300 µl de SDS al 10%, 375 µl de proteinasa K a 10 mg/ml y 200 µl de DTT a 1M). El lisado se purificó con 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (*Sigma-Aldrich*, San Luis, MO, EEUU) y se concentró con filtros *Amicon Ultra-4* de 30 kDa (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania). El extracto concentrado se purificó con *MinElute PCR Purification Kit* (*QIAGEN*) a volumen final de 75 µL.

Sílice en suspensión

El ADN se extrajo de 500 mg de polvo de hueso utilizando el método de extracción estándar de ADN antiguo, sílice en columna [98]. El polvo de hueso fue digerido con 2 ml de tampón de lisis (EDTA 0,5M, proteinasa K 0,14 mg/ml, rojo fenol 1:1000) a 37°C, durante 2 días. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante mezclado e incubado en agitación con tampón de *binding* (500 ml de Buffer PB de *QIAGEN*, cloruro de sodio 24.88 mM, acetato de sodio 87.6 mM y rojo fenol 1:1000) y 100 µl de sílice en suspensión, ajustándose el pH de cada muestra a 4-5 con ácido clorhídrico al 37%. Las muestras se centrifugaron y el precipitado de sílice se resuspendió en etanol frío al 80%, lavándose dos veces con etanol [71]. Las muestras se eluyeron con Buffer EB de *QIAGEN* y se purificaron con *MinElute PCR Purification Kit* (*QIAGEN*) a un volumen final de 75 µl).

Sílice en columna

El ADN se extrajo de 150 mg de polvo de hueso utilizando las columnas *High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche)* [52]. Para ello, 1 ml de tampón de extracción (45 ml de EDTA 0,5M, 3,75 ml de agua sin DNasa ni RNasa, y 25 µl de Tween-20), y 25 µl de proteinasa K de Roche (10 mg/ml) se añadió a cada muestra, incubándolas 24 h a 37°C y otras 24 h a 56°C. El lisado se centrifugó y se añadieron 10 ml de Buffer PB (*QIAGEN*) y 400 µl de acetado de sodio 3M al sobrenadante, incubándose 2 minutos. La mezcla se centrifugó utilizando las columnas *High Pure* y se lavaron dos veces con tampón PE (Roche). Las muestras se eluyeron dos veces con EB Buffer (*QIAGEN*) con un volumen final de 60 µl.

InnoXtract™ Bone

El ADN se extrajo de tres alícuotas de 40 mg de polvo de hueso utilizando el kit *InnoXtract™ Bone Kit (Innogenomics)*. A cada alícuota se añadieron 540 µl de *Lysis Buffer*, 42 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y 18 µl de DTT 1M, incubándose durante la noche a 56°C. Al sobrenadante se le añadieron 750 µl de *Bone DNA Binding Buffer* y 20 µl de suspensión de partículas magnéticas en una gradilla magnética *DynaMag™ 2 (ThermoFisher)*. Se lavaron dos veces con *Wash Buffer*, y otras dos con etanol al 80%, eluyéndose las muestras con *InnoXtract Elution Buffer*, mezclándose las alícuotas y concentrándose a 40 µl de volumen final.

PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit in AutoMate™ Express

El ADN se extrajo de tres alícuotas de 200 mg utilizando el kit *PrepFiler™ BTA Forensic DNA Extraction Kit* en un equipo de extracción automatizada *AutoMate™ Express (ThermoFisher)*, siguiendo un protocolo interno en el que a cada muestra se le añaden 540 µL de *Lysis Buffer*, 42 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y 18 µl de DTT, incubándose las muestras durante toda la noche a 56°C en agitación. En el equipo se fijó un volumen final de 20 µl, uniéndose las tres alícuotas a un volumen final de 60 µl.

Cuantificación de ADN

Los extractos de ADN se cuantificaron con el kit de cuantificación *Quantifiler™ Trio (ThermoFisher)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante [99] en un equipo de cuantificación mediante PCR a tiempo real *QuantStudio™ 5*.

Se analizaron cinco parámetros: la cantidad detectada de ADN de la diana de menor tamaño (80 pares de bases), la cantidad detectada de ADN de la diana de mayor tamaño (214 pares de bases), la cantidad detectada de ADN masculino (75 pares de bases), el índice de degradación (ratio entre la diana pequeña y la diana grande), y el ciclo umbral de amplificación del control interno de PCR (IPC).

Amplificación de ADN y visualización de resultados

La amplificación de ADN se realizó con el kit *GlobalFiler™ PCR Amplification Kit* siguiendo las recomendaciones del fabricante [100]. Se utilizaron 15 µl de cada extracto de ADN de cada método de extracción para la reacción de amplificación, haciéndose la electroforesis en un equipo *ABI 3500 Genetic Analyzer* siguiendo las recomendaciones del fabricante, analizándose los resultados con el *software* *GeneMapper™ ID-X v1.4*.

Se estudiaron cinco variables: 1) número de alelos que pasan el umbral analítico (50 RFU, determinado por validación interna), 2) número de alelos que pasan el umbral estocástico (365 RFU, determinado por validación interna), 3) RFU promedio, 4) balance de heterocigosidad (calculado la ratio entre el alelo más pequeño y el alelo más grande) y 5) el número de marcadores reportables (homocigotos con una altura mayor de 365 RFU o heterocigotos con una altura mayor al umbral analítico y un balance mayor de 0,6). Sólo se han tenido en cuenta los loci de tipo STR, 21 marcadores, excluyéndose el *Yindel*, la amelogenina y el *DYS385*.

Los análisis estadísticos se han hecho con el *software* estadístico *jamovi 2.2.5* [101].

7.2. Resultados y discusión

Resultados de cuantificación

Los resultados de cuantificación se muestran en la **Tabla 5**, incluyendo el promedio (\bar{x}) y el coeficiente de dispersión de cuartil, CQV, una medida robusta de la dispersión para datos que no tienen una distribución paramétrica, calculado como la relación entre los cuartiles Q_3 y Q_1 : $\frac{Q_3 - Q_1}{Q_3 + Q_1}$.

Se incluyen también los valores normalizados con la cantidad de polvo de hueso, el promedio por cada 100 mg.

Tabla 5. Resultados de cuantificación por método de extracción de ADN

Parámetro		<i>Ph-Chl-IA</i>	<i>Sílice (suspensión)</i>	<i>Sílice (columna)</i>	<i>InnoXtract™</i>	<i>PrepFiler™ BTA</i>
Fragmento pequeño (ng/µl)	\bar{x}	0,470	0,125	0,100	0,219	0,112
	CQV	0,942	0,927	0,926	0,911	0,921
Fragmento grande (ng/µl)	\bar{x}	0,032	0,009	0,007	0,014	0,007
	CQV	0,846	0,876	0,535	0,771	0,669
Fragmento masculino (ng/µl)	\bar{x}	0,367	0,108	0,067	0,160	0,086
	CQV	0,974	0,910	0,909	0,902	0,917
Índice de degradación (DI)	\bar{x}	28	53	36	91	34
	CQV	0,621	0,703	0,705	0,657	0,664
IPC (C _i)	\bar{x}	27,53	27,33	27,48	27,74	27,43
	SD	0,23	0,15	0,34	0,16	0,23
Fragmento pequeño (ng/µl/100mg)	\bar{x}	0,047	0,025	0,064	0,183	0,019
	CQV	0,942	0,927	0,928	0,911	0,921
Fragmento grande (ng/µl/100mg)	\bar{x}	0,003	0,002	0,004	0,011	0,001
	CQV	0,830	0,876	0,739	0,771	0,705
Fragmento masculino (ng/µl/100mg)	\bar{x}	0,034	0,022	0,045	0,133	0,014
	CQV	0,976	0,910	0,909	0,902	0,918

En general, se obtuvieron mayores cantidades de ADN en el extracto cuanto mayor fuera la cantidad de pulverizado de hueso de partida. En promedio, el protocolo de *Ph-Chl-IA* consiguió la mayor cantidad de ADN (fragmento pequeño) obtenido, seguido por *InnoXtract™*, sílice en suspensión, *PrepFiler™ BTA* y sílice en columna, obteniéndose con *Ph-Chl-IA* hasta cuatro veces más ADN que el método con peor rendimiento. La misma tendencia se observa en las dianas grande y masculina. El índice de degradación, siendo una ratio entre las dianas pequeña y grande de ADN, nos da una idea de la posible dispersión de la recuperación de fragmentos de distinto tamaño durante la extracción, indicando que el protocolo de *Ph-Chl-IA* recupera fragmentos pequeños y grandes en una proporción similar, mientras que *InnoXtract™* recupera más eficientemente fragmentos pequeños de ADN.

La situación cambia cuando se considera la eficiencia de cada método en función de la cantidad de pulverizado de hueso de partida (véase la **Figura 8**). *InnoXtract™* fue el protocolo con la mayor cantidad de fragmentos pequeños recuperados, seguido por sílice en columna, *Ph-Chl-IA*, sílice en suspensión, y *PrepFiler™ BTA*. La misma tendencia puede observarse en el resto de los parámetros, siendo el kit de *InnoGenomics* el que mejor rendimiento tiene en términos de cuantificación de ADN, recuperando de 10 (fragmento pequeño) a 100 (fragmento grande) veces más ADN que el método menos eficiente.

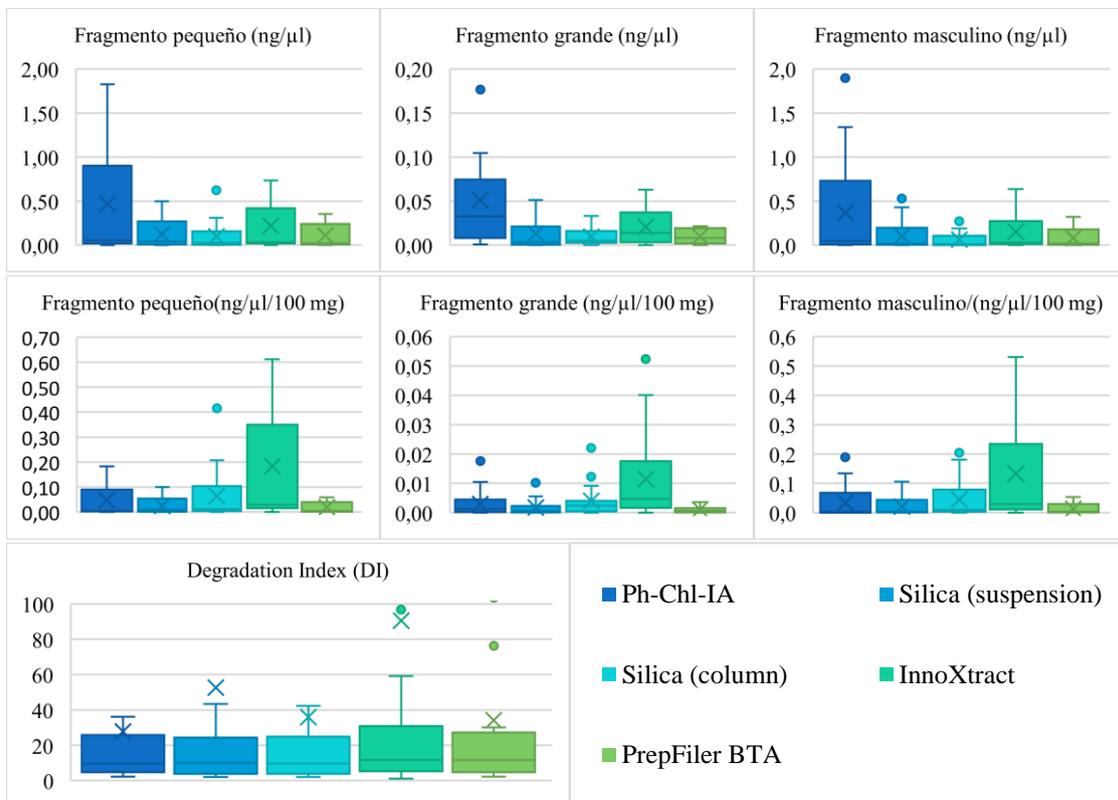


Figura 8. Diagramas de caja de los datos de cuantificación, en bruto (arriba) y normalizados (abajo).

La prueba ANOVA de un factor (test de Welch) con el protocolo de extracción de ADN como variable de agrupamiento mostró diferencias significativas en todas las variables de

cuantificación, excepto el índice de degradación. El test *post-hoc* de Tukey revela diferencias significativas entre los protocolos de extracción con respecto a la diana pequeña (entre *Ph-Chl-IA* y el resto, con un p-valor menor que 0,001), fragmento pequeño por miligramo de hueso (entre *InnoXtract*TM y el resto de protocolos con un p-valor < 0,001), la diana grande (entre *Ph-Chl-IA* y *PrepFiler*TM BTA, y entre sílice en columna y sílice en suspensión, p-valor < 0.003), y la diana grande por miligramo de hueso (entre *InnoXtract*TM y el resto de kits, p-valor < 0,001). No se observaron diferencias significativas, una vez más, con respecto al índice de degradación, lo que tiene sentido si tenemos en cuenta que son las mismas muestras las que se analizan con diferentes protocolos, por lo que cabe esperar que arrojen índices de degradación similares.

Finalmente, no se ha observado inhibición para ninguno de los protocolos probados, por lo que *a priori* todos ellos muestran eficiencia a la hora de reducir o eliminar posibles inhibidores de PCR encontrados en suelo o en matrices similares. Dicho esto, la literatura ha observado que el método de *Ph-Chl-IA* es menos eficiente a la hora de reducir inhibidores [102].

Y es que los resultados que pueden encontrarse en la literatura son diversos: un estudio de ADN antiguo encontró un mejor rendimiento con *DNA IQ*TM (kit de partículas magnéticas) que con sílice en suspensión, y estos a su vez fueron mejores que el protocolo de *Ph-Chl-IA*, siendo el protocolo de sílice en suspensión el mejor tras una revisión más exhaustiva [32]. Otro estudio realizado con muestras de los siglos V-XI encontró que se obtenía mayor cantidad de ADN con el protocolo de sílice en suspensión, seguido por sílice en columna, siendo *Ph-Chl-IA* el método menos eficiente [71]. Comparando *Ph-Chl-IA* con *PrepFiler*TM BTA, un estudio encontró un mejor rendimiento del primero frente al segundo con muestras dentales, si bien el automatizado se mostró más eficiente una vez normalizados los datos con la cantidad de pulverizado de ADN [103], lo que afirmó a su vez otro estudio comparando *PrepFiler*TM BTA con sílice en *suspension* en muestras dubitadas e indubitadas [104]. Un estudio preliminar encontró que los protocolos de sílice en suspensión y *PrepFiler*TM BTA daban mejores resultados de cuantificación que *InnoXtract*TM [105].

En general, la literatura encuentra los protocolos basados en partículas magnéticas como mejores que los manuales, y entre estos, que los protocolos basados en las sales caotrópicas y el sílice mejores que los basados en el fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. En este sentido, los resultados obtenidos concuerdan con lo que se viene apuntando por la bibliografía científica: el protocolo de *Ph-Chl-IA* es el que más cantidad de ADN ha obtenido (considerado tradicionalmente como el *gold standard*), y a su vez, *InnoXtract*TM (método con partículas magnéticas como fundamento químico) resulta el método más eficiente en términos de cantidad de ADN por miligramo de hueso. Es interesante también señalar que el protocolo de sílice en

columna, una vez normalizados los datos, tiene un rendimiento mayor que el de sílice en suspensión.

Resultados de los perfiles genéticos

Los resultados de los perfiles de ADN (número de alelos que sobrepasan el umbral analítico (UA), número de alelos que superan el umbral estocástico (UE), unidades relativas de fluorescencia (RFU), ratio de altura de picos (PHR), y número de loci reportables) se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Resultados de los perfiles de ADN por protocolo de extracción

Parámetro		<i>Ph-Chl-IA</i>	Sílice (suspensión)	Sílice (columna)	<i>InnoXtract</i> TM	<i>PrepFiler</i> TM BTA
Alelos >UA	\bar{x}	29	24	24	13	25
	CQV	0,125	0,362	0,333	1,000	0,404
Alelos >UE	\bar{x}	19	14	12	7	14
	CQV	0,268	0,643	0,750	1,000	0,655
RFU	\bar{x}	3640	2435	1483	1588	1358
	CQV	0,863	0,863	0,848	1,000	0,796
PHR	\bar{x}	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7
	CQV	0,134	0,049	0,072	0,117	0,089
Loci reportables	\bar{x}	15	12	11	6	12
	CQV	0,226	0,333	0,455	1,000	0,565
Alelos >UA/100 mg	\bar{x}	2,91	4,83	15,84	10,63	4,09
	CQV	0,125	0,362	0,333	1,000	0,404
Alelos >UE/100 mg	\bar{x}	1,87	2,74	8,21	5,97	2,27
	CQV	0,268	0,643	0,750	1,000	0,655
RFU/100 mg	\bar{x}	364	487,07	988,64	1323,58	226,26
	CQV	0,863	0,863	0,848	1,000	0,796
Loci reportables/100 mg	\bar{x}	1,48	2,34	7,47	5,07	1,99
	CQV	0,226	0,333	0,455	1,000	0,565

En promedio, el protocolo de *Ph-Chl-IA* detectó el mayor número de alelos, seguido por *PrepFiler*TM BTA, sílice en columna y sílice en suspensión, siendo *InnoXtract*TM el que ha detectado el menor número de alelos. La extracción orgánica también dio el mayor número de alelos que sobrepasaban el umbral estocástico, seguido por un empate entre *PrepFiler*TM BTA y sílice en suspensión, seguidos por sílice en columna, y, finalmente, *InnoXtract*TM. En otras palabras, el 65% de los alelos que se detectan por fenol/cloroformo/alcohol isoamílico sobrepasan el umbral estocástico, el 56% en caso de *PrepFiler*TM BTA, y 50% para el resto de los protocolos. *Ph-Chl-IA* fue también el método con los picos más altos en términos de RFU, seguido por sílice en suspensión, *InnoXtract*TM, sílice en columna, y *PrepFiler*TM BTA. Finalmente, *Ph-Chl-IA* fue el protocolo más eficiente en términos de marcadores reportables, seguido por sílice en suspensión, *PrepFiler*TM BTA, sílice en columna, e *InnoXtract*TM.

Observamos la misma situación que en los datos de cuantificación cuando normalizamos los datos con respecto a la cantidad de pulverizado de resto óseo, invirtiéndose las clasificaciones que se veían más arriba (véase la **Figura 9**). Sílice en columna fue el protocolo más eficiente en términos de alelos detectados, seguido por *InnoXtract*TM, sílice en suspensión, *PrepFiler*TM BTA, y *Ph-Chl-IA*. *InnoXtract*TM fue el protocolo con los picos más altos por miligramo de hueso,

seguido por sílice en columna, sílice en suspensión, Ph-Chl-IA y PrepFiler™ BTA. Finalmente, sílice en columna fue el método con mayor número de loci reportable por miligramo de resto óseo, seguido por *InnoXtract*™, sílice en suspensión, *PrepFiler*™ BTA, y *Ph-Chl-IA*. En ambos casos (datos normalizados y sin normalizar), la extracción orgánica presenta una menor dispersión, teniendo por tanto mayor estabilidad que el resto de métodos.

La prueba ANOVA de Welch con el protocolo de extracción de ADN como variable de agrupamiento reveló diferencias estadísticamente significativas en todas las variables, excepto la ratio de altura de picos (PHR), lo que tiene sentido teniendo en cuenta que la causa de esta variable reside más bien en la química del propio kit de amplificación. Un test *post-hoc* de Tukey mostró diferencias significativas por alelos detectados (entre *InnoXtract*™ y el resto de métodos, p-valor <0,001), por RFU (entre *InnoXtract*™ y *Ph-Chl-IA*, p-valor=0,023, y entre *Ph-Chl-IA* y *PrepFiler*™ BTA y sílice en columna, p-valor <0,05), por alelos detectados por miligramo de resto óseo (entre *InnoXtract*™ y *Ph-Chl-IA*, *PrepFiler*™ BTA, sílice en columna y sílice en suspensión, p-valor <0,05, entre *Ph-Chl-IA* y sílice en columna, p-valor < 0,001, entre *PrepFiler*™ BTA y sílice en columna, p-valor < 0,001, y entre sílice en columna y sílice en suspensión, p-valor < 0,001), por RFU por miligramo de hueso (entre *InnoXtract*™ y *Ph-Chl-IA*, *PrepFiler*™ BTA, y sílice en suspensión, p-valor < 0.01), y por loci reportable (entre *InnoXtract*™ and *Ph-Chl-IA* and *PrepFiler*™ BTA, p-valor < 0.01, entre *Ph-Chl-IA* y sílice en columna, p-valor < 0.001, y entre sílice en columna y *Ph-Chl-IA*, *PrepFiler*™ BTA, y sílice in suspensión, p-valor < 0.001).

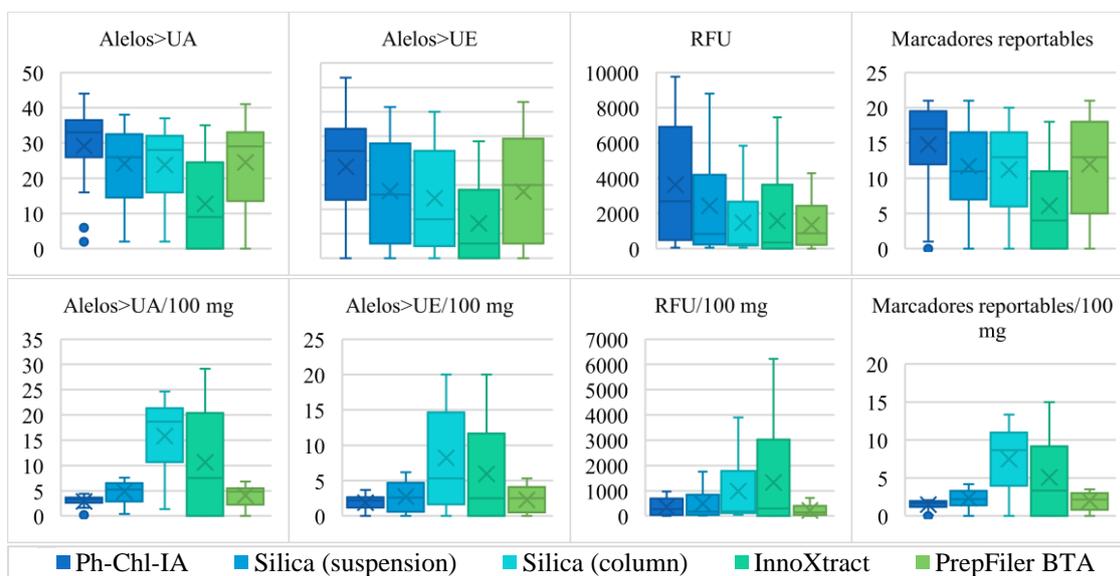


Figura 9. Diagramas de caja de los parámetros de los perfiles de ADN obtenidos por cada protocolo, arriba en bruto y abajo normalizados con la cantidad de pulverizado de resto óseo

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al balance de heterocigosidad, sin embargo, sí que se observaron con el tipo de hueso, obteniéndose con el

petroso mayores cantidades de ADN y perfiles más informativos (prueba ANOVA de Welch, p-valor <0.05).

La **Figura 10** muestra los RFU promedio obtenidos en cada locus por cada uno de los diferentes protocolos de extracción de ADN. En todos ellos se observa ese perfil de pendiente de esquí, siendo los loci de menor tamaño amplificados más que los de mayor tamaño. En segundo lugar, se observa que los resultados de RFU son consistentes, estando los RFU de cada loci en aproximada proporción entre los diferentes protocolos de extracción (esperable por otra parte teniendo en cuenta que este comportamiento tiene que ver más con la propia química del kit comercial). En tercer lugar, el éxito esperable de cada protocolo de extracción se repite en todos los locus (no hay marcadores que funcionen mejor en un protocolo que en otro), no observándose diferencias estadísticamente significativas.

Revisitando la literatura, se han obtenido mejores resultados de ADN mitocondrial con el protocolo de sílice en suspensión, siendo el protocolo de extracción orgánica el que peores resultados obtuvo [71]. Comparando *PrepFiler™ BTA* y *Ph-Chl-IA* y sílice en suspensión, el kit de partículas magnéticas obtuvo mejores resultados que el resto, dando mejores perfiles en términos de umbrales y marcadores reportables [103], y en torno a tres veces más alelos detectados que el sílice en suspensión [104]. Este último junto con *PrepFiler™ BTA* obtuvieron mejores resultados que *InnoXtract™* en secuenciación masiva, que se constituyó como un método de resultados variables y menor número de lecturas [105]. En definitiva, la literatura parece situar a *PrepFiler™ BTA* y el protocolo de sílice en suspensión como mejores que el de extracción orgánica e *InnoXtract™*. Sin embargo, nuestro estudio encuentra que *Ph-Chl-IA* es el método que obtiene un mayor número de alelos detectados, alelos reportables, RFU y marcadores reportables, mientras que los protocolos de sílice en columna e *InnoXtract™* se constituyen como los más eficientes. Es más: los perfiles de las muestras 1-3, negativos con los métodos de extracción orgánica y BTA, obtenían un resultado (parcial) con *InnoXtract™* y sílice en suspensión.

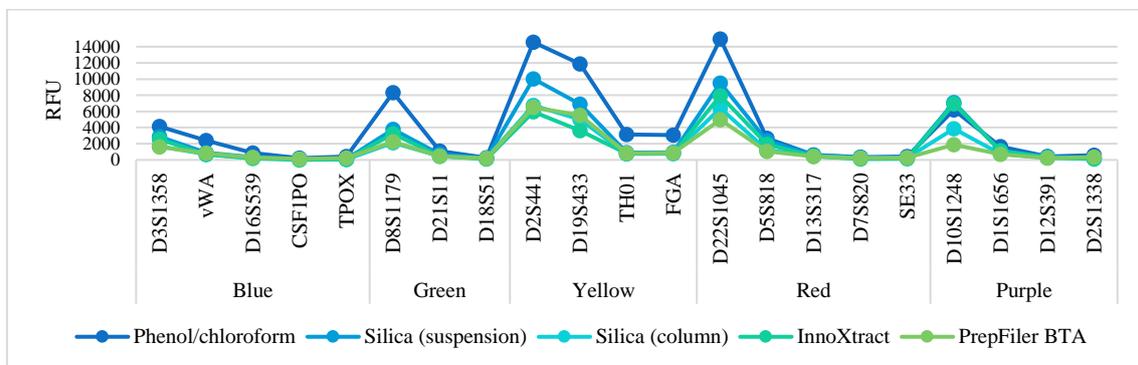


Figura 10. RFU promedio por marcador por método de extracción

Hay algunas cuestiones metodológicas que deben discutirse. En primer lugar, la cantidad de polvo de resto óseo de partida: se utilizaron las cantidades recomendadas por el protocolo o el fabricante en lugar de utilizar la misma cantidad de pulverizado en todos los protocolos, teniendo en cuenta que la química de cara protocolo está optimizada para una cierta cantidad de pulverizado. En segundo lugar, el método seguido con *InnoXtract™ Bone* (tres alícuotas concentradas con una centrifugadora a vacío), se desarrolló junto con el fabricante durante su validación interna. En tercer lugar, el protocolo utilizado con el kit *PrepFiler™ BTA* fue desarrollado mediante validación interna después de varias pruebas [106]: 50 mg de pulverizado, 200 mg de pulverizado, tres alícuotas de 200 mg, y cinco alícuotas de 500 mg, siendo el método presentado en este trabajo el mejor en términos de coste/beneficio. Finalmente, con respecto al conteo de alelos detectados, no se han duplicado los alelos observados como homocigotos, teniendo en cuenta que la muestra la constituye un resto óseo muy degradado, por lo que no pueden descartarse fenómenos estocásticos de *drop-out*, contándose únicamente los picos observados.

Asumiendo cada parámetro analizado como de igual importancia y considerando, no únicamente los mismos sino también su significancia estadística, se podría afirmar en base a los resultados obtenidos que *InnoXtract™* y *Ph-Chl-IA* fueron los mejores métodos en términos de recuperación de cantidad de ADN, mientras que *Ph-Chl-IA*, sílice en suspensión y sílice en columna fueron los mejores en términos de cuantificación y de calidad del perfil genético obtenido. En general, nuestros resultados sugieren que *Ph-Chl-IA* es el método de extracción que mejores resultados da con este tipo de muestras, mientras que sílice en columna e *InnoXtract™* son los más eficientes (teniendo en cuenta la cantidad de pulverizado de partida). Además, considerando los resultados de cuantificación, *InnoXtract™* se erige como un método prometedor cuando el objetivo del análisis es hacer secuenciación masiva, teniendo en cuenta que los tamaños de amplicón de estas aplicaciones. Hasta ahora, este método no ha sido sistemáticamente probado con este tipo de muestras.

El kit *PrepFiler™ BTA* automatizado con *AutoMate™ Express* ha tenido resultados razonablemente buenos, en torno a un 20% menos de marcadores reportables que el mejor protocolo. Este método de extracción debería ser especialmente considerado por su posibilidad de automatización, reduciendo el manejo de las muestras y con ello el riesgo de contaminación o de contaminación cruzada, amén de no utilizar reactivos químicamente peligrosos. En este sentido este método parece especialmente idóneo para el análisis rutinario de restos óseos degradados, pudiendo utilizarse de forma suplementaria un método de extracción manual, pero más eficiente (como *Ph-Chl-IA* o sílice en suspensión) para aquellas muestras en las que se obtenga un perfil negativo o parcial, conclusión a la que ha llegado ya algún trabajo previo [107].

El protocolo de extracción orgánica siempre se ha considerado el estándar de oro en la extracción de ADN por su versatilidad, rendimiento, y efectividad para reducir o eliminar inhibidores de PCR, pese a que el fenol/cloroformo/alcohol isoamílico es un reactivo peligroso y contaminante cuyos residuos deben ser tratados adecuadamente por los laboratorios que lo utilicen, además de ser un método laborioso que implica muchas transferencias entre tubos o filtros, incrementando el riesgo de contaminación. Las partículas paramagnéticas se utilizan en métodos que suelen tener en común la rapidez, son eficaces eliminando inhibidores, y son adaptables para ser automatizados, reduciendo el riesgo de contaminación y ahorrando tiempo, teniendo la contrapartida de un menor rendimiento [108]. Por supuesto, cada laboratorio debe validar el método de extracción que vaya a utilizar con sus propias muestras de rutina para evaluar su efectividad. Considerando todo lo expuesto, en la **Tabla 7** se resumen las ventajas e inconvenientes de cada método empleado.

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de los métodos analizados

	<i>Ph-ChI-IA</i>	<i>Sílice (suspensión)</i>	<i>Sílice (columna)</i>	<i>InnoXtract™</i>	<i>PrepFiler™ BTA</i>
Ventajas	-Alto rendimiento -Eliminación de componentes celulares -Gold standard en forense	-Rendimiento moderado -Reactivos no tóxicos -Gold standard en ADN antiguo	-Mayor eficiencia -Menos laborioso -Menor preparación de reactivos -Elimina inhibidores	-Automatizable -No requiere preparación de reactivos -Elimina inhibidores	-Automatizable -No requiere preparación de reactivos -Elimina inhibidores -Rápido
Inconvenientes	-Requiere más cantidad de muestra -Requiere purificación extra -Reactivos tóxicos -Laborioso	-Puede requerir purificación extra -Requiere medición de pH -Mayor tiempo de lisis -Requiere preparación de reactivos -Laborioso	-Mayor tiempo de lisis -Fallos si no se separa el pulverizado correctamente	-Menor rendimiento -Mayor pipeteo de las muestras	-Menor rendimiento -Coste elevado

8. Conclusiones

El análisis de ADN de restos óseos degradados son un desafío para cualquier laboratorio debido a la fragmentación del ADN endógeno. La extracción de ADN es un paso clave, no habiendo consenso en la literatura científica de qué método tiene mejor rendimiento o, más concretamente, que método funciona mejor según qué tipo de muestra.

No hay muchas comparaciones entre métodos de extracción con restos humanos críticos, señalándose en cualquier caso que sílice en suspensión y *PrepFiler™ BTA* son los métodos más eficientes con respecto al tradicional protocolo de extracción orgánica.

Este estudio ha comparado cinco métodos de extracción de ADN en restos humanos degradados: fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, sílice en suspensión, sílice en columna, *InnoXtract™* y *PrepFiler™ BTA* automatizado con el robot de extracción *AutoMate™ Express*.

Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico fue el método más eficiente, tanto en cuantificación como en los perfiles genéticos obtenidos, siendo en promedio el que mayor número de marcadores reportables obtenía. Sin embargo, una vez normalizados los datos con la cantidad de pulverizado de resto óseo, se observa que el protocolo de columnas de sílice fue el método más eficiente, consiguiendo buenos resultados teniendo en cuenta la relativamente escasa cantidad de pulverizado de resto óseo del que parte. Además, nuestro protocolo interno de *PrepFiler™ BTA* consigue resultados de buena calidad, constituyéndose como un método adecuado para la extracción en masa de restos óseos humanos.

Teniendo en cuenta esta información, nuestro laboratorio ha optado por efectuar dos extracciones independientes de los restos óseos que analiza: una automatizada con el kit *PrepFiler™ BTA* en *AutoMate™ Express* y una con el protocolo de extracción orgánica, obteniendo dos perfiles genéticos con los que se elabora un perfil consenso.

9. Referencias

- [1] S. Hummel, B. Herrmann, eds., *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*, Springer-Verlag, New York, 1994.
- [2] J.M. Butler, *Forensic DNA typing*, Elsevier, Burlington, 2005.
- [3] P.A. Barrio-Caballero, Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense, *Revista Española de Medicina Legal* 39 (2012) 54–62.
- [4] K.D. Eilbert, D.R. Foran, Polymerase Resistance to Polymerase Chain Reaction Inhibitors in Bone, *Journal of Forensic Sciences* 54 (2009) 1001–1007.
- [5] H.N. Poinar, The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples, *International Congress Series* 1239 1239 (2003) 575–579.
- [6] D.H. O'Rourke, M.G. Hayes, S.W. Carlyle, *Ancient DNA Studies in Physical Anthropology*, *Annu. Rev. Anthropol.* 29 (2000) 217–242.
- [7] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, *SWGDM Contamination Prevention and Detection Guidelines for Forensic DNA Laboratories*, (2017). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_c4d4dbba84f1400a98eaa2e48f2bf291.pdf (accessed July 13, 2021).
- [8] B.M. Kemp, D.G. Smith, Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth, *Forensic Science International* 154 (2005) 53–61.
- [9] M.M. Holland, D.L.D.L. Fisher, L.G. Mitchel, W.C.W.C. Rodríguez, J.J.J. Canik, C.R. Merril, V.W. Weedn, L.G. Mitchell, W.C.W.C. Rodríguez, J.J.J. Canik, C.R. Merril, V.W. Weedn, Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from the Vietnam War, *Journal of Forensic Sciences*, *JFSCA* 38 (1993) 542–553.
- [10] D.A. Merriwether, F. Rothhammer, R.E. Ferrell, R.E. Ferrel, Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA, *Experientia* 50 (1994) 592–601. <https://doi.org/10.1007/BF01921730>.
- [11] A. Alonso, Š. Anđelinoviæ, P. Martín, D. Sutloviæ, I. Erceg, E. Huffine, L. Fernández de Simón, C. Albarrán, M. Definis-Gojanoviæ, A. Fernández-Rodríguez, P. García, I. Drmiæ, B. Rezić, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples, *Croatian Medical Journal* 42 (2001) 260–266.
- [12] P. Korlević, T. Gerber, M.-T. Gansauge, M. Hajdinjak, S. Nagel, A.A.-P. & M. Meyer, Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth, *BioTechniques* 59 (2018).
- [13] H. Hayatsu, S.-K. kung Pan, T.T. Ukita, Reaction of Sodium Hypochlorite with Nucleic Acids and Their Constituents, *Chem. Pharm. Bull.* 19 (1971) 2189–2192. <https://doi.org/10.1248/cpb.19.2189>.
- [14] P. Korlević, M. Meyer, Pretreatment: Removing DNA Contamination from Ancient Bones and Teeth Using Sodium Hypochlorite and Phosphate, in: B. Shapiro, A. Barlow, P.D. Heintzman, M. Hofreiter, J.L.A. Paijmans, A.E.R. Soares (Eds.), *Ancient DNA Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 2019: pp. 15–19.
- [15] C. Ginther, L. Issel-Tarver, M.-C.C. King, Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth, *Nature Genetics* 2 (1992) 135–138.
- [16] R. Montiel, A. Malgosa, P. Francalacci, Authenticating Ancient Human Mitochondrial DNA, *Human Biology* 73 (2001) 689–713.
- [17] I.M. Shapiro, M.H. Moar, S. Ohno, G. Klein, Acetic acid treatment denatures DNA while preserving chromosomal morphology during the in situ hybridization procedure, *Experimental Cell Research* 115 (1978) 411–414.
- [18] D.L. Fisher, M.M. Holland, L. Mitchell, P.S. Sledzik, A.W. Wilcox, M. Wadhams, V.W. Weedn, Extraction, Evaluation, and Amplification of DNA from Decalcified and Undecalcified United States Civil War Bone, *Journal of Forensic Sciences* 38 (1993) 60–68.

- [19] A.C. Stone, M. Stoneking, mtDNA Analysis of a Prehistoric Oneota Population: Implications for the Peopling of the New World, *American Journal of Human Genetics* 62 (1998) 1153–1170.
- [20] M.-L. Kampmann, C. Børsting, N. Morling, Decrease DNA contamination in the laboratories, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 6 (2017) e577–e578. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.223>.
- [21] J.F. Mouret, M. Polverelli, F. Sarradini, J. Cadet, Ionic and radical oxidations of DNA by hydrogen peroxide, *Chemico-Biological Interactions* 77 (1991) 187–201.
- [22] H. Schroeder, P. de B. Damgaard, M.E. Allentoft, Pretreatment: Improving Endogenous Ancient DNA Yields Using a Simple Enzymatic Predigestion Step, in: B. Shapiro, A. Barlow, P. Heintzman, M. Hofreiter, J. Pajmans, A. Soares (Eds.), *Ancient DNA Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 2019: pp. 21–24.
- [23] M.B. Richards, B.C. Sykes, Authenticating DNA Extracted From Ancient Skeletal Remains, *Journal of Archeological Science* 22 (1995) 291–299.
- [24] T. Kalmár, C.Z. Bachrati, A. Marcsik, I. Raskó, A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones, *Nucleic Acids Research* 28 (2000) e67.
- [25] C. Lalueza-Fox, F. Luna Calderón, F. Calafell, B. Morera, J. Bertranpetit, MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean, *Ann. Hum. Genet.* 65 (2001) 137–151.
- [26] D. Gaudio, D.M. Fernandes, R. Schmidt, O. Cheronet, D. Mazzarelli, M. Mattia, T. O’Keeffe, R.N.M. Feeney, C. Cattaneo, R. Pinhasi, Genome-Wide DNA from Degraded Petrous Bones and the Assessment of Sex and Probable Geographic Origins of Forensic Cases, *Sci Rep* 9 (2019) 8226. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44638-w>.
- [27] J.C. Álvarez, C. Entrala, J.A. Lorente, F. Fernández-Rosado, E. Martínez-Espín, E. Rodríguez, E. Villanueva Cañadas, Análisis de ADN mitocondrial, *Forénsica* 1 (2001) 40–59.
- [28] R. Palmirotta, F. Verginelli, G.D. Tota, P. Battista, A. Cama, S. Caramiello, L. Capasso, R. Mariani-Costantini, Use of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in the Sex Typing of DNA Extracted from Archeological Bone, *International Journal of Osteoarcheology* 7 (1997) 605–609.
- [29] S.W. Carlyle, R.L. Parr, M.G. Hayes, D.H. O’Rourke, Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest, *American Journal of Physical Anthropology* 113 (2000) 85–101.
- [30] C.D. Matheson, T.H. Loy, Genetic Sex Identification of 9400-year-old Human Skull Samples from Cayönü Tepesi, Turkey, *Journal of Archaeological Science* 28 (2001) 569–575.
- [31] E. Morales Colón, M. Hernández, M. Candelario, M. Meléndez, T. Dawson Cruz, Evaluation of a Freezer Mill for Bone Pulverization prior to DNA Extraction: An Improved Workflow for STR Analysis, *Journal of Forensic Sciences* 63 (2018) 530–535. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13551>.
- [32] N. Rohland, M. Hofreiter, Comparison and optimization of ancient DNA extraction, *BioTechniques* 42 (2018) 343–352. <https://doi.org/10.2144/000112383>.
- [33] M. Knapp, A.C. Clarke, K.A. Horsburgh, E.A. Matisoo-Smith, Setting the stage - Building and working in an ancient DNA laboratory, *Annals of Anatomy* 194 (2012) 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.03.008>.
- [34] G.G. Fortes, A. Grandal-d’Anglade, B. Kolbe, D. Fernandes, I.N. Meleg, A. García-Vázquez, A.C. Pinto-Llona, S. Constantin, T.J. de Torres, J.E. Ortiz, C. Frischauf, G. Rabeder, M. Hofreiter, A. Barlow, Ancient DNA reveals differences in behaviour and sociality between brown bears and extinct cave bears, *Molecular Ecology* 25 (2016) 4907–4918. <https://doi.org/10.1111/mec.13800>.
- [35] E.A. Matisoo-Smith, A.L. Gosling, J. Boocock, O. Kardailsky, Y. Kurumilian, S. Roudesli-Chebbi, L. Badre, J.P. Morel, L.L. Sebaï, P.A. Zalloua, A European mitochondrial haplotype identified in ancient Phoenician remains from Carthage, North Africa, *PLoS ONE* 11 (2016) e0155046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155046>.
- [36] A.T. Gondek, S. Boessenkool, B. Star, A stainless-steel mortar, pestle and sleeve design for the efficient fragmentation of ancient bone, *BioTechniques* 64 (2018) 266–269. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0008>.

- [37] J.E. Stray, J.G. Shewale, Extraction of DNA from Human Remains, in: J.G. Shewale, R.H. Liu (Eds.), *Forensic DNA Analysis Current Practices and Emerging Technologies*, CRC Press, Boca Raton, 2014: pp. 65–75.
- [38] C. Finaughty, K.M. Reid, I.H. Alli, L.J. Heathfield, A first for forensic genetics in Africa: successful identification of skeletal remains from the marine environment using massively parallel sequencing, *Forensic Science International: Genetics* 49 (2020) 102370. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102370>.
- [39] QIAGEN, TissueLyser Handbook, Resources (2010). <https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/automation/tissueLyser-ii/>.
- [40] M. Hofreiter, Nondestructive DNA Extraction from Museum Specimens, in: B. Shapiro, M. Hofreiter (Eds.), *Ancient DNA Methods and Protocols*, Springer, New York, 2011: pp. 93–100. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9>.
- [41] E. Hagelberg, J.B. Clegg, Isolation and characterization of DNA from archaeological bone, *244* (1991) 45–50. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0049>.
- [42] S.M. Edson, J.P. Ross, M.D. Coble, T.J. Parsons, S.M. Barritt, Naming the Dead — Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains, *Forensic Science Review* 16 (2004) 64–89.
- [43] O.M. Loreille, T.M. Diegoli, J.A. Irwin, M.D. Coble, T.J. Parsons, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, *Forensic Science International: Genetics* 1 (2007) 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>.
- [44] M.N. Hochmeister, B. Budowle, Urs.V. Borer, U. Eggmann, C.T. Comey, R. Dirnhofer, Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains, *Journal of Forensic Sciences* 36 (1991) 1649–1661. <https://doi.org/10.1520/JFS13189J>.
- [45] S.T. Ferreira, K.A. Paula, F.A. via Maia, A.V. Moraes, A comparative study between two protocols for DNA extraction from bones, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4 (2013) e374–e375. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2013.10.190>.
- [46] J.M. Willard, D.A. Lee, M.M. Holland, Recovery of DNA for PCR Amplification from Blood and Forensic Samples Using a Chelating Resin, in: P.J. Lincoln, J. Thomson (Eds.), *Forensic DNA Profiling Protocols*, Humana Press, 1998: pp. 9–18. <https://doi.org/10.1385/0896034437>.
- [47] Y.M. Coulson-Thomas, A.L. Norton, V.J. Coulson-Thomas, R. Florencio-Silva, N. Ali, S. Elmrgghni, C.D. Gil, G.R.S. Sasso, R.A. Dixon, H.B. Nader, DNA and bone structure preservation in medieval human skeletons, *Forensic Science International* 251 (2015) 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.005>.
- [48] T. Tsuchimochi, M. Iwasa, Y. Maeno, H. Koyama, H. Inoue, I. Isobe, R. Matoba, M. Yokoi, M. Nagao, Chelating Resin-Based Extraction of DNA from Dental Pulp and Sex Determination from Incinerated Teeth with Y-Chromosomal Alphoid Repeat and Short Tandem Repeats, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 23 (2002) 268–271.
- [49] M. Höss, S. Pääbo, DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 3913–3914.
- [50] N. Rohland, M. Hofreiter, Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nature Protocols* 2 (2007) 1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>.
- [51] K.A. Melzak, C.S. Sherwood, R.F.B. Turner, C.A. Haynes, Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions, *Journal of Colloid and Interface Science* 181 (1996) 635–644. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0421>.
- [52] N. Rohland, H. Siedel, M. Hofreiter, A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput, *Molecular Ecology Resources* 10 (2010) 677–683. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02824.x>.
- [53] E. Huffine, J. Crews, B. Kennedy, K. Bomberger, A. Zimbo, Mass Identification of Persons Missing from the Break-up of the Former Yugoslavia: Structure, Function, and Role of the International Commission on Missing Persons, *Croatian Medical Journal* 42 (2001) 271–275.

- [54] T.J. Parsons, R. Huel, J. Davoren, C. Katzmarzyk, A. Milos, A. Selmanovic, L. Smajlovic, M.D. Coble, A. Rizvic, Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to highvolume casework on degraded skeletal remains, *Forensic Science International: Genetics* 1 (2007) 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.003>.
- [55] J. Davoren, D. Vanek, R. Konjhodžić, J. Crews, E. Huffine, T.J. Parsons, Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves, *Croatian Medical Journal* 48 (2007) 478–485.
- [56] R. Huel, S. Amory, A. Bilić, S. Vidović, E. Jasaragić, T.J. Parsons, DNA Extraction from Aged Skeletal Samples for STR Typing by Capillary Electrophoresis, in: *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics*, Humana Press, 2012: pp. 185–198. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_13.
- [57] C. Anderung, P. Persson, A. Bouwman, R. Elburg, A. Götherström, Fishing for ancient DNA, *Forensic Science International: Genetics* 2 (2008) 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.09.004>.
- [58] S.B. Lee, J.G. Shewale, DNA Extraction Methods in Forensic Analysis, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2017: pp. 2–11.
- [59] Applied Biosystems, PrepFiler® and PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kits, Quick Reference (2012).
- [60] Promega, Purification of DNA from Bone Samples Using Bone DNA Extraction Kit, Custom and DNA IQ™ Chemistry, Application Note (2019).
- [61] QIAGEN, Purification of DNA from bones and teeth using the EZ1® Advanced or EZ1 Advanced XL, QIAGEN Supplementary Protocol (2013). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=00069c66-ce82-4574-8a5c-7c8f7b16e625&lang=en> (accessed June 2, 2021).
- [62] Norgen Biotek Corp., Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Magnetic Bead System) – 50 Preps, Resources (2015).
- [63] Ademtech, Crime Prep Adem-Kits for casework, *Forensic Casework* (2019). <https://www.ademtech.com/forensic/casework/> (accessed June 2, 2021).
- [64] InnoGenomics, InnoXtract™ Bone DNA Extraction and Purification Kit User Guide, (2022).
- [65] MPbio, GENE CLEAN® Kit For Ancient DNA, (2022).
- [66] T. Kitayama, Y. Ogawa, K. Fujii, H. Nakahara, N. Mizuno, K. Sekiguchi, K. Kasai, N. Yurino, T. Yokoi, Y. Fukuma, K. Yamamoto, T. Oki, H. Asamura, H. Fukushima, Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method, *Legal Medicine* 12 (2010) 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.12.004>.
- [67] M. Piglionica, A. De Donno, S.L. Baldassarra, V. Santoro, A. Scorca, F. Introna, A. Dell’erba, Extraction of DNA from bones in cases where expectations for success are low, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 33 (2012) 322–327. <https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e3182519479>.
- [68] A. De Donno, F. Mele, S.L. Baldassarra, A. Martini, C. Lauretti, M. Favia, F. Introna, V. Santoro, Dna extraction from sternum bone for identification of a saponified body: Use of a modified protocol, *Anthropologischer Anzeiger* 77 (2020) 235–242. <https://doi.org/10.1127/anthranz/2020/1162>.
- [69] C. Cartozzo, B. Singh, E. Boone, T. Simmons, Evaluation of DNA Extraction Methods from Waterlogged Bones: A Pilot Study, *Journal of Forensic Sciences* 63 (2018) 1830–1835. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13792>.
- [70] L. Gielda, S. Rigg, Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue, *BMC Research Notes* 10 (2017) 737. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3066-y>.
- [71] D.C. Vinueza-Espinosa, C. Santos, C. Martínez-Labarga, A. Malgosa, Human DNA extraction from highly degraded skeletal remains: How to find a suitable method?, *Electrophoresis* 41 (2020) 2149–2158. <https://doi.org/10.1002/elps.202000171>.
- [72] F. Pagan, C. Lim, M. Keglovic, D. McNevin, Comparison of DNA extraction methods for identification of human remains, *Australian Journal of Forensic Sciences* 44 (2012) 117–127. <https://doi.org/10.1080/00450618.2011.610821>.

- [73] M.A. Nieves-Colón, A.T. Ozga, W.J. Pestle, A. Cucina, V. Tiesler, T.W. Stanton, A.C. Stone, Comparison of two ancient DNA extraction protocols for skeletal remains from tropical environments Number of text pages plus bibliography: 16 Number of figures: 4 Number of tables: 2 Number of supplementary files: 3 Abbreviated Title: Comparison of, (n.d.). <https://doi.org/10.1101/184119>.
- [74] M. Mckinnon, D. Higgins, Comparison of bone demineralisation procedures for DNA recovery from burned remains, *Forensic Science International: Genetics* 51 (2021) 102448. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102448>.
- [75] C. Xavier, M. Eduardoff, B. Bertoglio, C. Amory, C. Berger, A. Casas-Vargas, J. Pallua, W. Parson, Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age, *Genes* 12 (2021) 146. <https://doi.org/10.3390/genes12020146>.
- [76] M. Salamon, N. Tuross, B. Arensburg, S. Weiner, Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 13783–13788. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503718102>.
- [77] J. Jakubowska, A. Maciejewska, R. Pawłowski, Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation, *International Journal of Legal Medicine* 126 (2012) 173–178. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0590-5>.
- [78] F.E. Duijs, T. Sijen, A rapid and efficient method for DNA extraction from bone powder, *Forensic Science International: Reports* 2 (2020) 100099. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100099>.
- [79] T. Miyata, H. Ishikawa, H. Nakanishi, T. Ohmori, A comparison of three methods of DNA extraction from bone and tooth samples, *Japanese Journal of Forensic Science and Technology* 25 (2020) 131–139. <https://doi.org/10.3408/jafst.765>.
- [80] D. Vanek, M. Silerova, V. Urbanova, L. Saskova, J. Dubska, M. Beran, Genomic DNA extraction protocols for bone samples: The comparison of Qiagen and Zymo Research spin columns, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.09.060>.
- [81] L. Rubinstein, Comparing Two Automated Methods of DNA Extraction from Degraded Skeletal Remains, *Forensic Medicine and Anatomy Research* 09 (2021) 24–30. <https://doi.org/10.4236/fmar.2021.92003>.
- [82] E. Hagelberg, L.S. Bell, T. Allen, A. Boyde, S.J. Jones, J.B. Clegg, Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications The analysis of DNA from ancient bone, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333 (1991) 399–407. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0090>.
- [83] K. Imaizumi, K. Noguchi, T. Shiraiishi, K. Sekiguchi, H. Senju, K. Fujii, K. Yoshida, K. Kasai, M. Yoshino, DNA typing of bone specimens - The potential use of the profiler test as a tool for bone identification, *Legal Medicine* 7 (2005) 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2004.07.003>.
- [84] R. Alaeddini, Forensic implications of PCR inhibition - A review, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>.
- [85] C. Hänni, T. Brousseau, V. Laudet, D. Stehelin, Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts, *Nucleic Acids Research* 23 (1995) 881–882. <https://doi.org/10.1093/nar/23.5.881>.
- [86] S. Pääbo, AMPLIFYING ANCIENT DNA, in: *PCR Protocols*, Elsevier, 1990: pp. 159–166. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50024-x>.
- [87] M. Scholz, I. Giddings, C.M. Pusch, A Polymerase Chain Reaction Inhibitor of Ancient Hard and Soft Tissue DNA Extracts Is Determined as Human Collagen Type I, *Analytical Biochemistry* 259 (1998) 283–286. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2676>.
- [88] M. Sidstedt, P. Rådström, J. Hedman, PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412 (2020) 2009–2023.
- [89] D.Y. Yang, B. Eng, J.S. Wayne, J.C. Dudar, S.R. Saunders, Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns, *American Journal of Physical Anthropology* 105 (1998) 539–543. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199804\)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199804)105:4<539::AID-AJPA10>3.0.CO;2-1).

- [90] C. Cattaneo, D.M. Smillie, K. Gelsthorpe, A. Piccinini, A.R. Gelsthorpe, R.J. Sokol, A simple method for extracting DNA from old skeletal material, *Forensic Science International* 74 (1995) 167–174.
- [91] J. Ye, A. Ji, E.J. Parra, X. Zheng, C. Jiang, X. Zhao, L. Hu, Z. Tu, A Simple and Efficient Method for Extracting DNA From Old and Burned Bone, *Journal of Forensic Sciences* 49 (2004) 1–6. <https://doi.org/10.1520/JFS2003275>.
- [92] Promega Corporation, DNA IQ™ System—Small Sample Casework Protocol, *Technical Bulletin* (2019). <https://www.promega.es/products/forensic-dna-analysis-ce/dna-isolation/dna-iq-system/?catNum=DC6701#protocols>.
- [93] QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook, QIAquick PCR Purification Kit (2020). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en>.
- [94] M.T.P. Gilbert, H.-J. Bandelt, M. Hofreiter, I. Barnes, Assessing ancient DNA studies, *Trends in Ecology & Evolution* 20 (2005) 541–544. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.005>.
- [95] E. Willerslev, A. Cooper, Ancient DNA, *Proc. R. Soc. B.* 272 (2005) 3–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>.
- [96] Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, “Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación,” (1999). <https://www.ugr.es/~fjmartin/INFORMES/Criterios%20y%20estandares.pdf>.
- [97] Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul de la Junta de Andalucía, Caracterización media de las principales variables climáticas en Andalucía, (2022). https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/areas-tematicas/cambio-climatico-y-clima/clima-en-andalucia/caracterizacion_media_principales_variables_climaticas_andalucia.
- [98] M.E. Allentoft, M. Sikora, K.-G. Sjögren, S. Rasmussen, M. Rasmussen, J. Stenderup, P.B. Damgaard, H. Schroeder, T. Ahlström, L. Vinner, A.-S. Malaspinas, A. Margaryan, T. Higham, D. Chivall, N. Lynnerup, L. Harvig, J. Baron, P.D. Casa, P. Dąbrowski, P.R. Duffy, A.V. Ebel, A. Epimakhov, K. Frei, M. Furmanek, T. Gralak, A. Gromov, S. Gronkiewicz, G. Grupe, T. Hajdu, R. Jarysz, V. Khartanovich, A. Khokhlov, V. Kiss, J. Kolář, A. Kriiska, I. Lasak, C. Longhi, G. McGlynn, A. Merkevcicius, I. Merkyte, M. Metspalu, R. Mkrtychyan, V. Moiseyev, L. Paja, G. Pálfi, D. Pokutta, Ł. Pospieszny, T.D. Price, L. Saag, M. Sablin, N. Shishlina, V. Smrčka, V.I. Soenov, V. Szeverényi, G. Tóth, S.V. Trifanova, L. Varul, M. Vicze, L. Yepiskoposyan, V. Zhitenev, L. Orlando, T. Sicheritz-Pontén, S. Brunak, R. Nielsen, K. Kristiansen, E. Willerslev, Population genomics of Bronze Age Eurasia, *Nature* 522 (2015) 167–172. <https://doi.org/10.1038/nature14507>.
- [99] Thermo Fisher Scientific, Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits, User Guide (2018). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf> (accessed July 29, 2021).
- [100] ThermoFisher Scientific, GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits, User Guide (2019). <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2F4477604.pdf>.
- [101] The jamovi project, jamovi (Version 2.2.5), (2021). <https://www.jamovi.org> (accessed July 5, 2022).
- [102] Q. Hu, Y. Liu, S. Yi, D. Huang, A comparison of four methods for PCR inhibitor removal, *Forensic Science International: Genetics* 16 (2015) 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.001>.
- [103] J. Zoranjic, J.W. Tay, N.S. Mountford, M.S. Rye, Optimisation of an Automated DNA Extraction Method for Bone and Teeth Samples and Applicability to Two Forensic Cases, *Forensic Sciences* 1 (2021) 194–201. <https://doi.org/10.3390/forensicsci1030017>.
- [104] L. Hasap, W. Chotigeat, J. Pradutkanchana, W. Asawutmangkul, T. Kitpipit, P. Thanakiatkrai, Comparison of two DNA extraction methods: PrepFiler® BTA and modified

- PCI-silica based for DNA analysis from bone, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7 (2019) 669–670. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.132>.
- [105] Deem, Emily Lucia, Extraction efficiency testing of degraded bone samples: comparing four DNA extraction methods for downstream massively parallel sequencing applications, Western Carolina University, 2022. <https://libres.uncg.edu/ir/wcu/f/Deem2022.pdf>.
- [106] Applied Biosystems, Protocol for DNA extraction from Bone Powder using the PrepfilTMer BTA Express Kit, (2010).
- [107] M. Date Chong, S. Sheehan, J. Battaglia, D.J. Wescott, J. Wallin, Comparative study of Rapid DNA versus conventional methods on compromised bones, *Forensic Science International: Genetics* 63 (2023) 102825. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102825>.
- [108] K.W.Y. Chong, Z. Thong, C.K.-C. Syn, Recent trends and developments in forensic DNA extraction, *WIREs Forensic Science* 3 (2021) e1395. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1395>.

10. Anexo. Datos suplementarios

Ph/Ch/IA										
	QTrio Peq	QTrio Gran	QTrio Y	QTrio DI	Ct	>UA	>UE	RFU	HB	Loci rep
1	0,0003	0,0001	0,0003	3	27,55	2	0	72		0
2	0,0004	0,0001	0,0003	8	28,00	3	0	93	0,5	1
3	0,0060		0,0073		28,06	6	0	130	0,7	2
4	0,0536	0,0127	0,0755	4	27,60	42	30	1610	0,5	21
5	0,0151	0,0049	0,0101	3	27,84	37	17	494	0,6	17
6	0,0567	0,0119		5	27,53	40	27	2984	0,4	20
7	0,0554	0,0248	0,0488	2	27,51	38	23	2684	0,2	19
8	0,0106	0,0022	0,0077	5	27,76	29	7	287	0,7	12
9	0,0294	0,0033	0,0191	9	27,76	35	17	486	0,6	19
10	0,7412	0,0242	0,6315	31	27,39	32	24	7927	0,7	16
11	0,5252	0,0145	0,4631	36	27,60	35	23	6361	0,8	17
12	0,0066	0,0008	0,0075	8	27,45	16	5	281	0,4	6
13	0,0261	0,0030	0,0241	9	27,35	24	16	807	0,8	12
14	0,0492	0,0090	0,0398	5	27,29	33	15	974	0,8	18
15	0,8663	0,0570	0,7425	15	27,35	37	32	8058	0,8	20
16	1,0905	0,1044		10	27,18	33	26	7105	0,8	21
17	0,2598	0,0007	0,2360	360	27,31	18	9	1646	0,7	8
18	1,0675	0,0302	0,7300	35	27,47	34	23	6121	0,8	17
19	1,4463	0,0794	1,3375	18	27,50	36	27	6735	0,8	19
20	0,7523	0,0692	0,8050	11	27,69	32	23	5065	0,7	15
21	0,9338	0,0328	0,7954	28	27,52	36	28	7918	0,8	21
22	1,1813	0,0683	0,0004	17	27,28	28	22	8061	0,7	17
23	0,7139	0,0224	0,5366	32	27,23	30	18	4174	0,7	17
24	1,8244	0,1764	1,8957	10	27,62	44	37	9751	0,8	20
25	0,0330	0,0074	0,0365	4	27,33	28	19	1189	0,7	15
Sílice (suspension)										
	QTrio Peq	QTrio Gran	QTrio Y	QTrio DI	Ct	>UA	>UE	RFU	HB	Loci rep
1	0,0004	0,0002	0,0002	2	27,44	2	0	66		0
2	0,0013	0,0004	0,0006	3	27,59	10	0	83	0,7	2
3	0,0027	0,0002	0,0020	14	27,38	8	0	113	0,5	2
4	0,0118	0,0008	0,0137	16	27,27	27	10	317	0,8	11
5	0,0386	0,0105	0,0283	4	27,45	38	22	838	0,7	21
6	0,0219	0,0071	0,0156	3	27,23	36	18	664	0,7	19
7	0,0091	0,0021	0,0088	4	27,14	25	1	179	0,8	10
8	0,0066	0,0012	0,0086	5	27,34	12	0	167	0,7	3
9	0,0426	0,0050	0,0249	9	27,01	32	15	456	0,7	16
10	0,3003	0,0124	0,3245	24	27,46	30	27	7643	0,7	17
11	0,3351	0,0090	0,2847	37	27,18	36	24	4010	0,7	16
12	0,0027	0,0010	0,0024	3	27,54	14	0	139	0,6	4
13	0,0107	0,0033	0,0118	3	27,46	22	7	364	0,7	10
14	0,0182	0,0038	0,0170	5	27,34	26	12	485	0,7	11
15	0,2402	0,0143	0,2419	17	27,29	31	25	5908	0,8	16
16	0,1045	0,0024	0,0002	43	27,37	22	15	3136	0,8	13
17	0,1541	0,0006	0,1029	240	27,03	17	10	1785	0,8	9
18	0,0634	0,0001	0,0453	634	27,43	21	11	1353	0,7	10
19	0,1272	0,0010	0,1503	134	27,35	30	19	3444	0,7	15
20	0,3476	0,0514	0,4304	7	27,44	35	29	6038	0,8	19
21	0,0622		0,0595		27,37	15	13	2874	0,8	8
22	0,3770	0,0277		14	27,35	33	26	7342	0,8	19
23	0,3394	0,0139	0,2782	24	27,21	32	23	4384	0,8	16
24	0,4988	0,0510	0,5285	10	27,32	36	31	8800	0,8	20
25	0,0066	0,0007	0,0067	10	27,15	14	5	295	0,7	6

Sílice (columna)										
	QTrio Peq	QTrio Gran	QTrio Y	QTrio DI	Ct	>UA	>UE	RFU	HB	Loci rep
1	0,0003		0,0001		27,64	2	0	82		0
2			0,0001		27,73	3	0	67		0
3	0,0032		0,0016		27,65	16	3	214	0,6	6
4	0,0183	0,0027	0,0221	7	27,44	22	2	143	0,8	10
5	0,0058	0,0018	0,0051	3	27,52	29	7	267	0,5	13
6	0,0121	0,0056	0,0127	2	27,63	32	8	267	0,6	15
7	0,0132	0,0051	0,0160	3	27,65	29	3	203	0,7	11
8	0,0029	0,0009	0,0039	3	27,80	4	0	71		0
9	0,0060	0,0006	0,0060	10	27,84	24	2	162	0,8	6
10	0,1579	0,0062	0,1454	25	27,74	32	19	2430	0,8	16
11	0,1541	0,0036	0,1255	42	27,43	30	16	1768	0,7	15
12	0,0012	0,0002	0,0014	6	27,44	5	0	138		0
13	0,0051	0,0011	0,0050	4	27,53	16	17	234	0,6	6
14	0,0105	0,0033	0,0065	3	27,49	23	6	267	0,6	10
15	0,0891	0,0061	0,0852	15	27,60	35	24	2342	0,8	19
16	0,1697	0,0184		9	27,46	32	28	3712	0,8	20
17	0,0328	0,0001	0,0320	505	27,52	12	6	699	0,9	6
18	0,1213	0,0049	0,0875	25	27,45	32	21	2469	0,8	15
19	0,6221	0,0206	0,2710	30	26,00	37	27	3466	0,8	20
20	0,1833	0,0138	0,1912	13	27,34	34	23	3269	0,7	18
21	0,1349	0,0053	0,1187	26	27,40	28	20	2875	0,8	15
22	0,2143	0,0108		20	27,46	30	23	3521	0,7	17
23	0,1196	0,0049	0,0945	25	27,34	26	18	2334	0,9	13
24	0,3104	0,0332	0,3067	9	27,43	37	30	5843	0,7	20
25	0,0084	0,0020	0,0087	4	27,37	24	5	231	0,7	9
InnoXtract™										
	QTrio Peq	QTrio Gran	QTrio Y	QTrio DI	Ct	>UA	>UE	RFU	HB	Loci rep
1	0,0031	0,0025	0,0031	1	27,80	16	1	168	0,6	5
2	0,0003		0,0002		27,85	0	0	0		0
3	0,0070	0,0008	0,0050	9	27,70	19	1	160	0,7	7
4	0,0231	0,0032	0,0393	7	27,66	28	11	505	0,6	11
5	0,0177	0,0056	0,0141	3	27,73	35	17	524	0,7	18
6	0,0325	0,0093	0,0323	3	27,75	4	2	433	0,3	2
7	0,0181	0,0036	0,0130	5	27,74	22	7	282	0,8	10
8	0,0348	0,0125	0,0384	3	27,57	9	6	433	0,7	4
9	0,0349	0,0066	0,0277	5	27,68	2	0	175	0,4	1
10	0,2755	0,0010	0,2615	272	27,98	0	0	0		0
11	0,3078	0,0002	0,2872	1271	27,96	0	0	0		0
12	0,0073	0,0001	0,0094	59	27,89	0	0	0		0
13	0,0243		0,0302		28,09	0	0	0		0
14	0,0195	0,0020	0,0182	10	27,58	4	0	53		0
15	0,5338	0,0305	0,4105	17	27,70	7	5	2265	0,3	3
16	0,4218	0,0439	0,0002	10	27,47	12	8	4127	0,6	6
17	0,0847	0,0005	0,0679	175	27,65	7	3	356	1,0	2
18	0,5494	0,0057	0,3379	97	28,05	0	0	0	0,0	0
19	0,6530	0,0211	0,5323	31	27,74	14	10	4086	0,6	8
20	0,5920	0,0480	0,5580	12	27,76	27	24	6105	0,7	15
21	0,2959	0,0099	0,2321	30	27,56	20	18	4122	0,7	11
22	0,4168	0,0281		15	27,57	29	22	5274	0,7	15
23	0,3641	0,0138	0,2491	26	27,49	32	20	3180	0,8	17
24	0,7341	0,0627	0,6359	12	27,82	32	24	7459	0,7	17
25	0,0356	0,0048	0,0307	7	27,68	0	0	0		0

PrepFiler™ BTA										
	QTrio Peq	QTrio Gran	QTrio Y	QTrio DI	Ct	>UA	>UE	RFU	HB	Loci rep
1	0,0003				27,78	0	0	0		0
2	0,0003	0,0002	0,0003	2	27,60	0	0	0		0
3	0,0033		0,0030		27,66	6	0	118	0,7	2
4	0,0225	0,0056	0,0234	4	27,63	41	24	801	0,6	20
5	0,0095	0,0019	0,0066	5	27,70	30	8	302	0,5	15
6	0,0242	0,0087	0,0208	3	27,77	38	32	1592	0,7	21
7	0,0199	0,0071	0,0218	3	27,72	36	27	1377	0,6	20
8	0,0074	0,0021	0,0073	4	27,74	29	5	274	0,5	10
9	0,0136	0,0008	0,0088	18	27,63	31	9	313	0,6	14
10	0,3174	0,0041	0,2645	76	27,60	26	19	4001	0,8	13
11	0,1963	0,0019	0,1602	103	27,14	25	14	1273	0,8	12
12	0,0017		0,0018		27,43	2	0	68		0
13	0,0091	0,0011	0,0082	9	27,27	10	1	188	0,8	3
14	0,0112	0,0020	0,0112	6	27,30	26	6	281	0,7	10
15	0,1155	0,0080	0,1241	14	27,29	33	25	2441	0,8	17
16	0,2314	0,0200	0,0002	12	27,37	31	26	4051	0,8	19
17	0,0454	0,0001	0,0428	339	27,28	14	5	656	0,9	5
18	0,2483	0,0082	0,1856	30	27,28	29	15	1105	0,8	14
19	0,3398	0,0192	0,3205	18	27,37	28	15	886	0,8	13
20	0,2567	0,0217	0,2555	12	27,23	38	25	3034	0,8	20
21	0,2646	0,0098	0,2140	27	27,25	33	20	2961	0,8	18
22	0,3517	0,0162		22	27,23	26	21	4277	0,9	13
23	0,0756	0,0027	0,0646	28	27,18	33	16	1361	0,8	17
24	0,2279	0,0196	0,2211	12	27,07	35	26	2422	0,8	18
25	0,0101	0,0017	0,0077	6	27,18	13	1	157	0,7	5

Capítulo 3. Cuantificación de ADN



En el arte de la investigación criminal es de la mayor importancia poder reconocer entre diversos hechos cuáles son secundarios y cuáles son cruciales.

Sherlock Holmes, *El squire de Reigate*)



Resumen: La cuantificación de ADN es un paso importante en su análisis, pues permite una evaluación de la cantidad y de la calidad del ADN obtenido en la extracción, lo que permite replantear las estrategias a seguir en función de los resultados obtenidos. Este capítulo hace una revisión de los métodos que se han venido utilizando para cuantificar ADN en restos óseos para, a continuación, evaluar el comportamiento de los cuatro principales kits comerciales disponibles actualmente en el ámbito forense (Quantifiler™ Trio, PowerQuant®, Investigator® Quantiplex® Pro, e InnoQuant® HY) en un total de 62 muestras de restos humanos críticos. Los resultados sugieren que InnoQuant® HY es el kit más sensible, y muestran la utilidad del nuevo parámetro de degradación para hacer comparativas entre kits comerciales diferentes.

Palabras clave: Cuantificación de ADN; Muestras críticas; qPCR; Restos humanos; rtPCR

Abstract: DNA quantification is a crucial step in its analysis as it allows for an assessment of the quantity and quality of the DNA obtained during extraction. This evaluation enables a reconsideration of the strategies to be employed based on the obtained results. This chapter reviews the methods that have been used for DNA quantification in bone remains. Subsequently, it assesses the performance of the four main commercial kits currently available in the forensic field (Quantifiler™ Trio, PowerQuant®, Investigator® Quantiplex® Pro, and InnoQuant® HY) using a total of 62 samples from critical human remains. The results suggest that InnoQuant® HY is the most sensitive kit and demonstrate the utility of the new degradation parameter for making comparisons between different commercial kits.

Keywords: Critical samples; DNA quantification; Human remains; qPCR; rtPCR

1. Introducción

Con el auge de las técnicas de amplificación directa, donde la extracción de ADN es un paso opcional, casi parece que la cuantificación de ADN se ha convertido en una técnica alternativa en algunas casuísticas forenses. Sin embargo, hay muchos casos en los que la cuantificación es un paso, no solo obligatorio, sino menesteroso, para optimizar la concentración de *input* necesaria para el proceso de amplificación. Y es que la cuantificación no solamente nos informe sobre la cantidad de ADN presente en una muestra: gracias a las técnicas de cuantificación mediante PCR a tiempo real (qPCR, rt-PCR), donde la amplificación de ADN se monitoriza en cada ciclo, se puede determinar el índice de degradación, el sexo del perfil del que procede la muestra, la presencia de una mezcla de varios contribuyentes de diferentes sexos, o la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra. Toda esta información proporcionada por la cuantificación de ADN permite a los investigadores dirigir o incluso reorientar el análisis de ADN, ya sea optimizando la estrategia de amplificación, o incluso redefiniendo la extracción de ADN. La cuantificación, en esencia, ayuda a ahorrar costes y trabajo, y permite optimizar el análisis de ADN.

Y es que la cuantificación de ADN es un paso obligatorio en la mayoría de las recomendaciones internacionales, como es la *Federal Bureau Investigation Quality Assurance Standards* [1], que en el punto 9.4 señala que todas las muestras forenses deben ser cuantificadas previamente a la amplificación, salvo que el laboratorio tenga validado un sistema de amplificación directa. Otro tanto puede decirse del *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories* [2].

La cuantificación de ADN es importante por dos razones [3]. La primera, es un paso necesario porque permite calcular el pequeño rango de *input* de ADN necesario para la mayoría de los kits comerciales de amplificación de STRs, normalmente entre 0,5 y 1 ng de ADN. Si la cantidad añadida a la reacción está por debajo de ese rango, se pueden observar fenómenos como perfiles parciales, drop-out alélico, drop-in alélico o incluso un perfil en blanco. Demasiado ADN añadido a la reacción puede causar artefactos en el electroferograma, como picos *pull-up*, pese a que los analizadores genéticos actuales cuentan con algoritmos bioinformáticos para mitigar estos problemas. La segunda razón es que la cuantificación ahorra tiempo y dinero, porque dependiendo de los resultados obtenidos el flujo de trabajo se puede reorientar o reconsiderar, o incluso se puede introducir un proceso de purificación, o en casos extremos, tomar otra muestra si es posible. Finalmente, la cuantificación de ADN es crucial cuando se trabaja con ADN en restos óseos antiguos [4], como veremos.

2. Métodos de cuantificación de ADN antiguo

La cuantificación de ADN en el análisis forense ha pasado por dos fases diferentes: primero, los analistas querían conocer el total de ADN contenido en un extracto, lo que tenía el problema de que no se cuantificaba específicamente ADN humano [5], por lo que se fueron desarrollando diferentes técnicas que fueron variando en especificidad [6].

2.1. Métodos de cuantificación de ADN no basados en ácidos nucleicos

Determinar que estamos ante un indicio biológico suele empezar con un examen visual del lugar de los hechos, que puede ser afinado *in situ* con la aplicación de técnicas como las luces forenses o las pruebas de orientación de indicios biológicos, o en el laboratorio de manera preliminar con las mismas técnicas u otros instrumentos como el microscopio. Localizar una mancha de sangre, semen o saliva nos puede dar una idea aproximada de si podemos esperar mucha o poca cantidad de ADN.

2.1.1. Examen macroscópico

Históricamente el examen visual y táctil del indicio se utilizaba para hacer una estimación de la cantidad de indicio biológico, y por ende de ADN, disponible. Y es que los genetistas forenses solían buscar manchas de sangre del tamaño aproximado de una manera, que era lo que se necesitaba para para los métodos que detectaban polimorfismos con enzimas de restricción (RFLP) de loci de repeticiones en número variable (VNTR) [6].

Cabe preguntarse si el examen macroscópico de los huesos, en concreto, el estado de degradación que pueda determinarse visualmente, puede ser un predictor del éxito o fracaso del posterior análisis de ADN. En un estudio realizado sobre restos óseos antiguos mediante análisis de ADN mitocondrial se vio que, sorprendentemente, no hay correlación entre el examen visual de la degradación del hueso -1) superficie del hueso con descamación mínima, 2) superficie del hueso con descamación en láminas, 3) hueso fragmentado con fragmentos de >1cm, 4) hueso fragmentado con fragmentos de <1cm- y la cantidad o calidad de ADN obtenido, por lo que el aspecto del hueso parece ser un mal predictor del análisis de ADN [7]. Sería interesante ver, no obstante, si aspectos como el color tienen un mayor poder predictivo, como se ha visto en estudios sobre restos incinerados [8].

2.1.2. Examen microscópico

El examen microscópico de las manchas de semen para detectar espermatozoides es algo común, y permite calcular aproximadamente la cantidad de ADN que se puede extraer teniendo en cuenta que la cantidad de ADN por célula es conocido, aproximadamente unos 3 pg [6]. En este sentido, las diferencias observadas entre diferentes cuantificaciones de ADN realizadas sobre fluidos depositados en papel FTA se explica en base a la diferente cantidad de células por volumen de fluido biológico, que depende del fluido en cuestión [9].

Con respecto a los restos óseos, aunque tradicionalmente se aconseja que el muestreo se realice en hueso cortical, se ha visto que el hueso esponjoso de los restos óseos de manos y pies contienen una mayor cantidad de ADN por unidad de masa, lo que se puede deber a que estos elementos contenían una mayor cantidad de células cuando el individuo estaba vivo, o bien que la degradación es menor en este tipo de indicios [10]. También es cierto que este tejido es más susceptible que el hueso cortical a la acción degradativa de microorganismos y ambiente. Por otra parte, el tipo de resto óseo que se muestra, como ya se ha dicho, permite deducir si cabe esperar una mayor o menor cantidad de ADN [11].

2.2. Métodos de cuantificación de ADN total genómico

Los primeros métodos de cuantificación de ADN implicaban la medición de la absorbancia del mismo a 260 nm, o bien la medición de la fluorescencia del mismo al unirse a diferentes sustancias. Estos métodos tienen la desventaja de que no son muy sensibles, consumiendo una cantidad apreciable de una valiosa muestra forense, además de que no son específicos para el ADN, por lo que sustancias como proteínas o fenol procedentes de la extracción pueden arrojar un falso positivo [3].

2.2.1. Espectrofotometría UV

La espectrofotometría ultravioleta (**Figura 1**) fue un método utilizado para cuantificar ADN antiguo durante los años 90 [12]. Para hacer la cuantificación los aparatos contaban con una cubeta de en torno a 50 μ l, midiendo la absorbancia de, primero un blanco con el solvente, y luego las muestras, a 260 y 280 nm; la cantidad de ADN se obtiene con $(A_{260} \cdot V_{\text{cubeta}}) / V_{\text{extracto}}$, multiplicando la absorbancia a 260 nm por el volumen de la cubeta y dividiendo el resultado por el volumen total de extracto [13]. La relación A_{260}/A_{280} permite calcular la pureza: las proteínas absorben a 280nm, lo que reducirá el ratio [14]. El sistema más utilizado para este tipo de cuantificación es NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific, Massachusets, WA, USA).

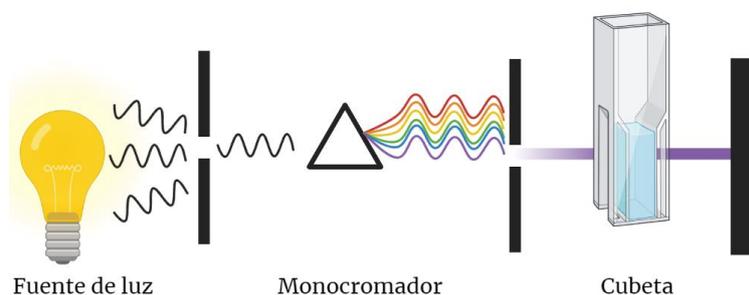


Figura 1. Esquema de la espectrofotometría UV. Editado con Biorender

Esta técnica presenta varias desventajas, como es la sobreestimación de los resultados por la presencia de nucleótidos y ADN monocatenario, la interferencia de proteínas y otros materiales como el fenol, y la escasa sensibilidad del ensayo [15]. Tanto este método como la fluorimetría, que veremos a continuación, han sido probados en análisis de ADN de restos óseos antiguos,

tanto los sistemas NanoDrop UV como Qubit, viéndose que no son válidos para este tipo de muestras en tanto en cuanto sobreestiman la cantidad de ADN presente en las mismas [16].

2.2.2. Fluorimetría

En lugar de medir la absorbancia del ADN, se puede observar la fluorescencia emitida por un fluorocromo intercalado al ADN (**Figura 2**), en un ensayo que se denomina fluorimetría. El sistema más utilizado para ensayos de fluorimetría probablemente sea Qubit (QIAGEN, Hilden, Alemania). En un poca cantidad de muestra se introduce un agente intercalante, normalmente PicoGreen™, que emite fluorescencia únicamente cuando se encuentra hibridado el ADN de doble cadena, por lo que se puede relacionar la fluorescencia emitida con la cantidad de material genético existente en la muestra, pudiendo detectar cantidades tan pequeñas como 25 µg/ml [17]. Sin embargo, este método sigue siendo no específico para ADN humano, y como se señaló más arriba, sobreestima la cantidad de ADN.

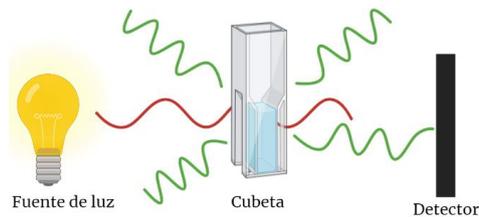


Figura 2. Esquema de la fluorimetría. Editado con Biorender

2.2.3. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel (**Figura 3**), de poliacrilamida o agarosa, se utiliza para separar, analizar, identificar o purificar fragmentos de ADN a través de su migración aplicando un campo eléctrico. Los geles de agarosa y poliacrilamida admiten una gran variedad de formas, tamaños y porosidades, dependiendo estos parámetros de los fragmentos que se vayan a analizar, de manera que, a menor tamaño de estos, mayor concentración tendrá que tener el gel para su correcta visualización. Los geles de acrilamida son más complicados de manejar, corriéndose casi siempre en vertical, mientras que los de agarosa tienen menor poder de resolución, pero un mayor grado de separación. Hasta cierto tamaño, la velocidad de migración del ADN disminuye con el tamaño del mismo, y es proporcional a la intensidad del campo eléctrico [18]. La localización de las bandas se hace con un transiluminador UV y un agente intercalante que emitirá fluorescencia al unirse con el ADN, tradicionalmente bromuro de etidio [13], cuyo uso ha sido desplazado por el Gel Red® (Biotium, Fremont, CA, USA), mucho menos peligroso para el operario.

La técnica consiste en preparar un gel, entre 0,8 y 2% en el caso de la agarosa, y añadir el intercalante al 10%. En los pocillos se disponen estándares de cuantificación y las muestras, de manera que la cantidad de ADN presente en las mismas será aquella para la que se presente la

misma intensidad de fluorescencia con respecto a los patrones, con un límite de detección de 1 ng. Una banda difusa nos sugerirá la presencia de degradación en las muestras.

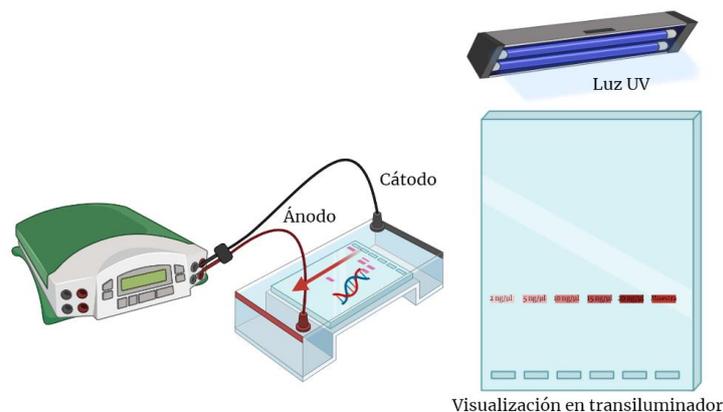


Figura 3. Esquema de la electroforesis en gel. Editado con Biorender

A principios de los años 90 se describía la utilización de la electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para cuantificar ADN antiguo [19]. Pese a su bajo coste, sencillez y sutil indicación de degradación, esta técnica es poco sensible y no específica para ADN humano.

2.3. Métodos específicos para humanos y primates superiores

La cuantificación de ADN mediante espectrofotometría, fluorimetría o geles de agarosa cumplían su función, pero el desarrollo de la PCR y de kits de amplificación cada vez más sensibles hizo necesario determinar con más precisión la presencia de ADN humano en la muestra, y no el ADN microbiano que en ocasiones se encuentra en las mismas. Es por ello que surgieron tres métodos, conocidos por sus nombres comerciales: Quantiblot™ (ThermoFisher Scientific) y AluQuant™ (Promega Corporation).

2.3.1. Slot blot con sonda D17Z1

Este método se ejecutaba en 1,5 horas y detectaba hasta 150 pg de ADN humano, basándose en la hibridación de oligonucleótidos biotinilados a la muestra de ADN inmovilizada en una membrana de nylon, sondas complementarias a una secuencia de ADN específica de primates del cromosoma 17, D17Z1 (**Figura 4**). El correspondiente complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) forma una unión no covalente muy fuerte que es posible detectar con luminol, que es oxidado por la peroxidasa, emitiendo luminiscencia [20]. Esta técnica se desarrolló en forma de kit comercial dando lugar a QuantiBlot® Human DNA Quantitation Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). La cuantificación de la muestra se basaba en la comparación de la misma con una dilución seriada de patrones, de 0,15 a 10 ng, con un total de 480 muestras por kit [21].

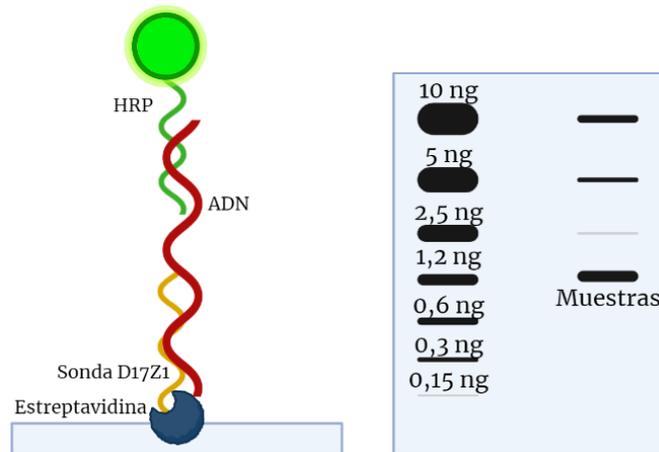


Figura 4. Esquema de la cuantificación mediante slot blot con sonda D17Z1. Editado con Biorender

La utilización de esta técnica para la cuantificación de ADN antiguo fue muy popular durante los comienzos de los años 2000 [22,23]. Sin embargo, pese a no verse afectada por la actividad de los inhibidores de la PCR (métodos que veremos a continuación) fue desplazada por sus limitaciones: se trata de un método semicuantitativo, sus resultados se encontraban por debajo de los rangos de ADN mínimos con los que poder obtener un perfil (dando falsos negativos), los resultados se ven afectados por el estado de degradación del ADN o por la presencia de ADN microbioano [24].

2.3.2. Cuantificación mediante secuencias Alu

Las secuencias Alu son un tipo de secuencia de ADN repetitivo que debe su nombre a que presentan sitios de unión para la enzima de restricción AluI, de aproximadamente 300 pares de bases, usualmente localizadas en regiones intergenómicas en un número elevado (en torno a 500 000 copias), que evolutivamente apareció hace unos 65 millones de años con la irradiación de los primates [25]. En base a estas características, Promega (Madison, WI, USA) desarrolló el kit de cuantificación AluQuant™ (**Figura 5**), que mide la cantidad de ADN humano presente en una muestra. La muestra se desnaturaliza para permitir la hibridación de la sonda, lo que cuando se produce inicia dos reacciones enzimáticas: una primera reacción de pirofosforilación, en la que una ADN polimerasa cataliza la adición de un pirofosfato en el extremo 3' del ADN bicatenario (hibridado con la sonda), liberando un dNTP (deoxinucleósido trifosfato), que en una segunda reacción (en la que interviene una quinasa) pasa de ser adenosina difosfato a adenosina trifosfato (ATP), que en una segunda incubación transforma luciferina en luciferasa, emitiendo luminiscencia capaz de cuantificar 0,1-50 ng de ADN [26].

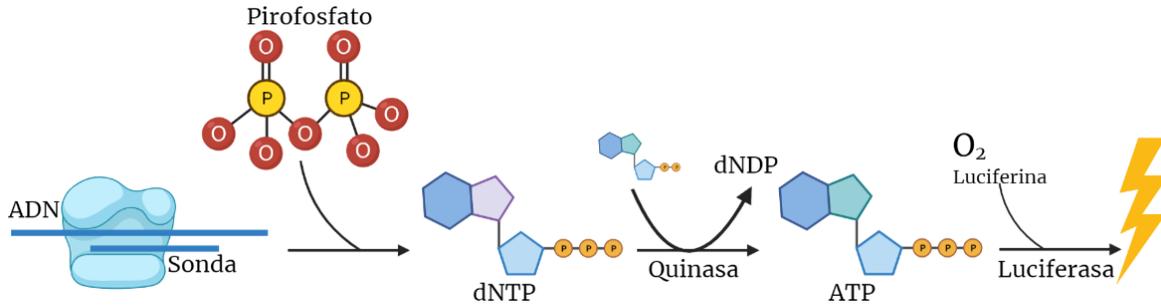


Figura 5. Esquema de la cuantificación mediante secuencias Alu. Editado con Biorender

Este sistema se utilizó en estudios de ADN antiguo en restos óseos por medir concentraciones mucho menores que el espectrofotómetro y por no estar afectado por la degradación de la muestra, además de ser específico para ADN humano [27]. Sin embargo, este método fue desplazado, igual que sus predecesores, por las ventajas ofrecidas por la PCR a tiempo real.

2.4. Cuantificación de ADN con PCR a tiempo real

La qPCR o PCR a tiempo real (rt-PCR), como aproximación a la cuantificación de ADN en el contexto forense, se basa en kits comerciales específicamente diseñados para la misma (Quantifiler® de Thermo Fisher Scientific, Plexor® de Promega, e Investigator Quantiplex® de QIAGEN).

Actualmente, la cuantificación en Genética Forense tiene dos objetivos principales: determinar la cantidad y la calidad (degradación) del extracto de ADN. En base a esta información, los siguientes pasos del análisis de ADN pueden modificarse, ya sea ajustando el factor de dilución en la amplificación, purificar la muestra, cambiar el protocolo de extracción de la muestra con uno más eficiente, o incluso probar con otra muestra si está disponible. Teniendo esto en cuenta, la qPCR tiene diversas aplicaciones interesantes en ADN antiguo [28]:

- 1) *Optimización de la extracción de ADN.* Hay diversos protocolos de extracción disponibles, manuales y automatizados. Conocer la cantidad de ADN recuperado en la extracción por los diferentes protocolos disponibles en el laboratorio permite determinar qué protocolo se utilizará en función de las características de la muestra.
- 2) *Detección de inhibidores de PCR.* Los ensayos de qPCR introducen un control interno de PCR (IPC), un oligonucleótido artificial que no se encuentra en la naturaleza, por lo que si no hay amplificación del IPC, puede haber un inhibidor presente en la muestra. En ese caso se puede plantear un paso de purificación.
- 3) *Determinación de la degradación del ADN.* Si se amplifican dos fragmentos de ADN diferentes en cada reacción de qPCR, uno largo (de aproximadamente 200-300 pares de bases) y uno corto (70-100 pares de bases) se puede determinar el índice de degradación en

función de las cantidades relativas obtenidas para uno y otro en la muestra. Esto permite replantear la amplificación.

- 4) *Determinación del sexo y detección de contaminaciones o mezclas.* Algunos kits comerciales incluyen una diana de ADN humano y otra de ADN humano masculino, lo que permite determinar el sexo del individuo del que proviene la muestra, calcular la ratio hombre/mujer en caso de mezclas, y detectar posibles contaminaciones.
- 5) *Bibliotecas NGS.* Si se tiene implementada una plataforma de secuenciación de nueva generación, es necesario construir una biblioteca que tiene que ser cuantificada con precisión. Las muestras de ADN antiguo no se caracterizan por tener grandes cantidades de ADN, por lo que la qPCR se vuelve una herramienta muy interesante antes y después de la fase de enriquecimiento.

El *fundamento* de la cuantificación mediante PCR a tiempo real es el siguiente. Todo ensayo de PCR tiene tres fases bien diferenciadas según progresa la reacción:

- 1) *Fase de crecimiento exponencial.* Al principio, suponiendo un rendimiento del 100% de la reacción, el número de amplicones se duplica con cada ciclo.
- 2) *Fase de crecimiento lineal.* A medida que se van consumiendo los dNTPs y los primers la velocidad de reacción va disminuyendo, de manera que pasa de un crecimiento aritmético a un crecimiento geométrico.
- 3) *Fase de meseta.* En esta etapa los reactivos se han consumido y no hay más reacción de polimerización de ADN, por lo que el número de amplicones permanece constante.

Estas fases pueden verse si se representan gráficamente la fluorescencia detectada versus el número de ciclos (**Figura 6**), dando una función sigmoide. El mejor momento de la reacción para medir la fluorescencia sería la fase exponencial, debido a que el número de productos de PCR en el siguiente ciclo será, precisamente, el doble, o en el ciclo anterior la mitad, por lo que puede predecirse perfectamente. Si definimos un punto arbitrario en el que puede detectarse la fluorescencia por encima del ruido de fondo, está claro que a mayor cantidad de ADN presente en el pocillo, harán falta menos ciclos para ser detectado, y por tanto alcanzar ese ciclo umbral (C_T) de detección [29]. Si representamos gráficamente el ciclo umbral de diferentes patrones de concentración conocida y el logaritmo de la concentración de la cantidad de ADN, podemos obtener un modelo de regresión lineal, una curva de calibración que puede ser utilizada para determinar la cantidad de ADN presente en la muestra problema (**Figura 7**).

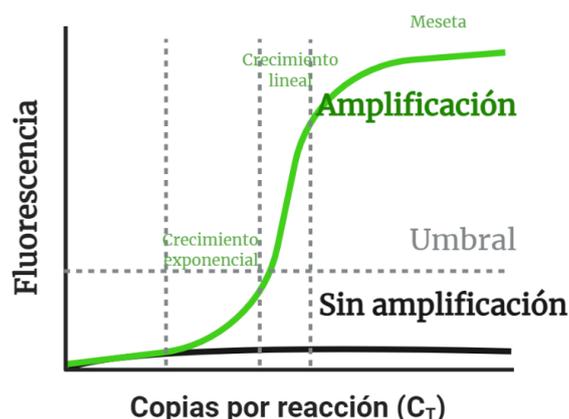


Figura 6. Fluorescencia detectada vs Ciclos. Editado con Biorender

Es por ello que es importante, cuando se hace un ensayo de qPCR, conocer el coeficiente de determinación, R cuadrado o R^2 , que informe de la bondad del ajuste del modelo de regresión lineal calculando la proporción de variación de la variable dependiente que es predecible a partir de la variable independiente. Se calcula como el cuadrado del coeficiente de correlación, por lo que va de 0 a 1, de manera que cuanto más cercano a 1 mejor será la bondad del ajuste de la curva de calibración [30].

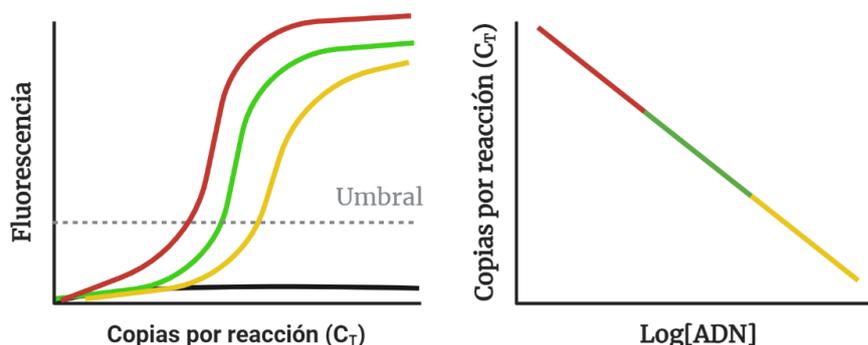


Figura 7. Gráfico fluorescencia vs. ciclo en PCR a tiempo real. Puede la línea de ciclo umbral (C_T), y el modelo de regresión lineal generado con el ciclo umbral vs. Logaritmo de la concentración de ADN, generado con los datos de amplificación obtenidos. Editado con Biorender

Con el objetivo de detectar la fluorescencia mientras se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, se han desarrollado diversos sistemas de PCR a tiempo real, normalmente con un software específico que automáticamente calcula la correlación lineal, el coeficiente de correlación lineal, y la cantidad de ADN presente en nuestras muestras. Los sistemas de qPCR combinan dos técnicas diferentes que, observará el lector, no son ajenas a lo que se viene diciendo: termociclado y fluorimetría. Hay cuatro componentes básicos en un sistema de qPCR [31]: una *fente de luz*, que determinará el rango de reporteros (*reporter*) utilizados; un *sistema de detección*, que determinará el rango espectral y la sensibilidad; un mecanismo de *termociclador*, cuyo objetivo es alcanzar rápidamente una temperatura determinada y mantenerla de forma constante; y un *software* que controle el ensayo y haga los cálculos pertinentes. El termociclador

será el que lleve a cabo la reacción de PCR, de manera que la fuente de luz se aplique sobre las muestras, que conforme avance la reacción emitirán fluorescencia, detectada por un sensor de píxeles activos (CMOS). Como puede verse en la **Figura 8**, aplicando filtros de excitación y emisión se pueden utilizar en una misma qPCR diferentes reporteros.

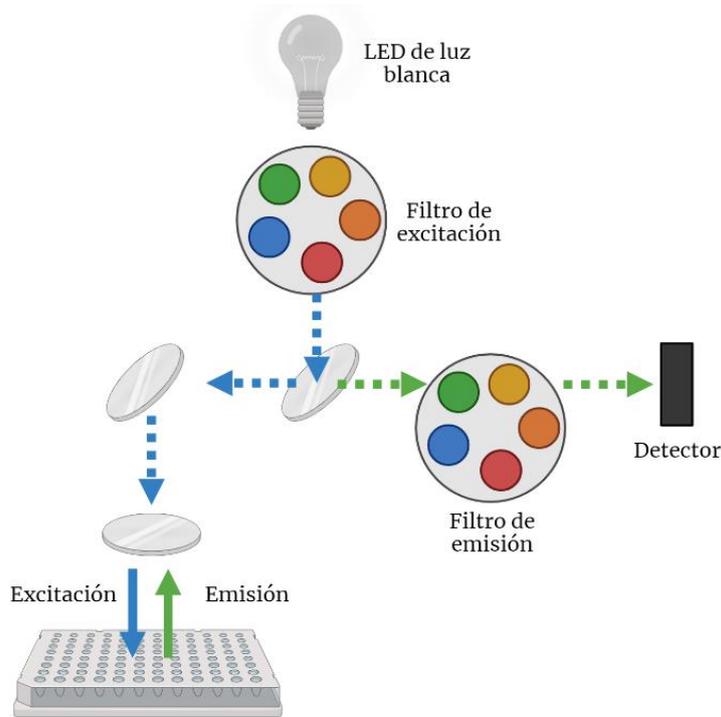


Figura 8. Esquema de un instrumento de qPCR. Editado con Biorender

2.4.1. Química Taqman®

La reacción en cadena de la polimerasa tuvo un gran desarrollo desde que se inventó, y su utilidad se vio aumentada con la introducción de la *Taq* polimerasa (*Thermophilus aquaticus*), que mejoró la especificidad del proceso. La *Taq* polimerasa tiene una actividad exonucleasa 5' → 3', es decir, que la polimerasa va a degradar cualquier oligonucleótido que haya hibridado entre los primers *forward* y *reverse* [32]. Esta es la piedra angular de la qPCR: la sonda *Taqman* (**Figura 9**), llamada así por su gran parecido con el personaje de videojuegos Pac-Man. Las sondas *Taqman* son oligonucleótidos de 18-30 pares de bases diseñados para tener una temperatura de desnaturalización cercana a la temperatura óptima para la extensión del ADN de interés. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño de estos oligonucleótidos, se les suele añadir una proteína de unión al ADN (*minor groove binder*, MGB), que aumenta la temperatura de desnaturalización de la sonda [33].

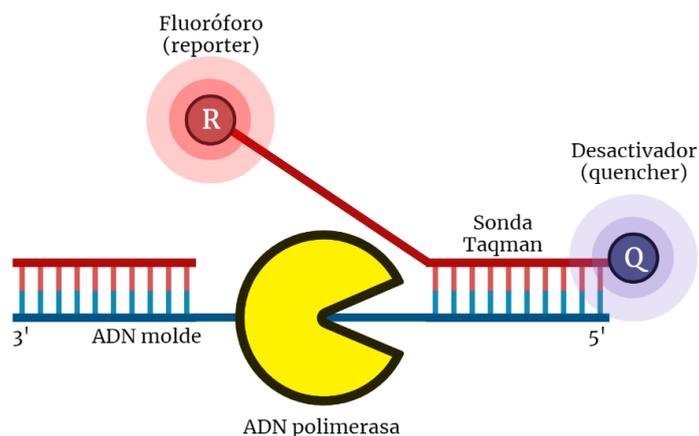


Figura 9. Diagrama de la sonda Taqman [32]. Editado con Biorender

Lo que hace especial a las sondas Taqman es que están unidas a dos tipos de fluoróforos diferentes que se transfieren energía mutuamente cuando están físicamente cercanos, uno será el reportador (*reporter*), y el otro desactivador (*quencher*), unidos a los extremos 5' y 3' de la sonda respectivamente. Cuando la ADN polimerasa empieza la síntesis entre los dos cebadores, la actividad exonucleasa 5'→3' hidroliza la sonda de manera que tanto el fluoróforo como su desactivador quedan liberados, de manera que el fluoróforo, sin la influencia de su contrario, puede emitir fluorescencia medible cuando se aplica cierta longitud de onda. En la **Tabla 1** se muestran los fluoróforos y desactivadores más comunes.

2.4.2. Química SYBRGreen®

SYBER Green® I consiste en un fluoróforo que se une únicamente al ADN de doble cadena (véase la **Figura 10**), y cuya fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena existente en el pocillo. Teniendo en cuenta que la reacción de PCR a tiempo real parte de una pequeña cantidad de ADN, el material genético bicatenario que va a ser detectado será únicamente producto de PCR. Será durante la fase exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa cuando la fluorescencia de SYBR® Green detectada se duplica con cada ciclo hasta que alcance la fase de meseta; de esta manera, la cantidad inicial de ADN existente en la muestra será la diferencia entre el ciclo umbral de la misma y el ciclo umbral de una curva estándar [34].

Tabla 1. Fluoróforos y sus desactivadores recomendados [35].

Color	Reportador	Alternativa	DYE-5'-T		Desactivador recomendado	Color
			EX	EM		
	Biosearch Blue™	-	352	447	BHQ-1	BHQ-0 430-520 nm
	FAM	-	495	520	BHQ-1	
	TET	-	521	536	BHQ-1	
	CAL Fluor® Gold 540	VIC/TET/JOE	522	544	BHQ-1	BHQ-1 480-580 nm
	JOE	-	529	555	BHQ-1	
	VIC	-	538	554	-	
	HEX	-	535	556	BHQ-1	
	CAL Fluor Orange 560	VIC/HEX/JOE	538	559	BHQ-1	
	Quasar® 570	CY3	548	566	BHQ-2	BHQ-2 559-670 nm
	ABY®	-	-	580	-	
	Cy™ 3.5	-	581	596	-	
	ROX	-	586	610	BHQ-2	
	CAL Fluor Red 610	TEXAS RED/ ROX/ ALEXA FLUOR® 594	590	610	BHQ-2	
	JUN®	-	-	617	-	
	Pulsar ® 650	-	460	650	BHQ-2	
	Cy 5	-	646	669	-	
	Quasar 670	CY5	647	670	BHQ-2, BHQ-3	
	Cy 5.5	-	675	694	-	
	Quasar 705	CY5.5	690	705	BHQ-2, BHQ-3	BHQ-3 620-730 nm

SYBR® Green es una cianina asimétrica comúnmente usada en electroforesis en gel debido a sus propiedades de unión con el ADN bicatenario. En un ensayo de PCR cuantitativa se

necesitan el ADN molde, este fluoróforo y una pareja de cebadores, de manera que se puede detectar hasta 1 pg de ADN [36]. Esta química alternativa tiene las ventajas de que reduce la manipulación de la muestra y ser de menor coste, pero algunos estudios sugieren que esta molécula tiene cierta afinidad a unirse a amplicones ricos en guanina y citosina o de mayor tamaño, lo que unido a su unión no específica a cualquier molécula de ADN bicatenario puede generar problemas en contextos forenses [37]. Sin embargo, este método presenta una gran ventaja, y es que el ensayo de cuantificación puede ser libremente diseñado por el investigador al poder elegir cualquier pareja de cebadores para cuantificar exactamente su región de interés. Para trabajar con esta química hay diversos kits disponibles: SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), SYBR® Green JumpStart™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), o QuantiTect® SYBR® Green PCR (QIAGEN, Hilden, Alemania).

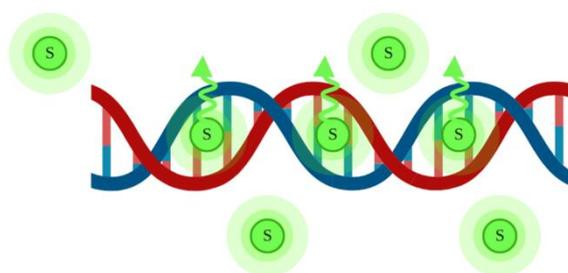


Figura 10. Esquema de SYBR® Green. Editado con Biorender

2.4.3. Kits comerciales de qPCR

Actualmente hay disponibles diversos kits comerciales de PCR a tiempo real, que pueden verse resumidos en la **Tabla 2**. Veámoslos más pormenorizadamente a continuación.

Tabla 2. Kits comerciales para cuantificación utilizados en ADN antiguo.

Casa comercial	Kit	Dianas	Formato	Tiempo
ThermoFisher	Quantifiler™ Trio	Corto 80 pb Largo 214 pb Masculino 75 pb IPC 130 pb	400 reacciones	~45 min
Promega	PowerQuant®	Corto 84 pb Largo 294 pb Masculino 136 pb Masculino 81 pb	200 reacciones 800 reacciones	~60 min
QIAGEN	Quantiplex	Humano 146 pb IPC 200 pb	200 reacciones	~60 min
	Quantiplex HYres	Humano 146 pb Masculino 129 pb IPC 200 pb	200 reacciones	~60 min
	Quantiplex Pro	Corto 91 pb Largo 353 pb Masculino 81 pb IPC 434 pb	200 reacciones	~60 min

	Quantiplex Pro RGQ	Corto 91 pb Largo 353 pb Masculino 81 pb Masculino 359 pb IPC 434 pb	200 reacciones	~60 min
InnoGenomics	InnoQuant® HY	Largo 207 pb Corto 80 pb Masculino 80 pb IPC 172 pb	60 reacciones 200 reacciones	<45 min

Quantifiler Trio (ThermoFisher Scientific)

El kit de cuantificación Quantifiler™ Trio combina cuatro ensayos 5' nucleasa: dos dianas específicas para humanos, con un amplicón largo (214 pb ABY™-QSY) y otro corto (80 pb VIC™-MGB) de PCR, un ensayo específico de ADN humano masculino (75 pb FAM-MGB), y un control interno (IPC, 130 pb, JUN™-QSY™) de PCR. Cada diana consiste en una pareja de cebadores y una sonda TaqMan® etiquetadas con fluoróforos. El kit viene en un formato de 400 reacciones, preparándose por cada ensayo una dilución seriada de patrones de 50,000 ng/μl, 5,000 ng/μl, 0,500 ng/μl, 0,050 ng/μl, y 0,005 ng/μl [38]. La utilización de un fragmento corto y uno largo permite el cálculo de un índice de degradación (DI), dado por la expresión:

$$DI = \frac{[Diana\ pequeña\ de\ ADN]}{[Diana\ grande\ de\ ADN]}$$

Quantifiler™ Trio ha sido validado para muestras forenses de ADN antiguo [39], y de restos óseos con respecto al índice de degradación calculado por el software del kit [40], por lo que es utilizado ampliamente en los diferentes estudios de ADN antiguo actuales [41–44]. Se ha visto que los valores de cuantificación y de DI obtenidos permiten reorientar la amplificación, como se muestra en la **Tabla 3**. El kit es capaz de detectar cantidades de hasta 1 pg/μl de ADN, aunque se han obtenido resultados en cantidades inferiores, si bien tiene un rango óptimo de hasta 5-50 pg pg/μl, si bien se ha observado que, debido a factores desconocidos, la diana larga da valores de cuantificación mayores a la diana corta [45].

Tabla 3. Estrategias recomendadas en función del índice de degradación (DI) y cantidad de ADN obtenidos en el ensayo de qPCR [40].

		Cantidad de ADN	
		<33.3 pg/μl > 3 pg/ μl	>33.3 pg/ μl
DI	DI <4	Perfil completo o parcial esperable. Se recomienda el máximo de ADN.	Perfil complete esperable. Se recomienda la cantidad normal de ADN.
	DI >4	Perfil parcial o negative esperable. Se aconseja la máxima cantidad de ADN.	Perfil parcial esperable. Se recomienda cantidad alta de ADN.

PowerQuant® (Promega)

El kit PowerQuant® System, de cinco colores y cuatro dianas basado en sondas de hidrólisis incluye una diana corta de ADN humano autosómico (84 pb FAM), una diana larga de ADN humano autosómico (294 pb Quasar®), dos dianas de ADN humano del cromosoma Y (81 y 136 pb CAL Fluor®) y un IPC (435 pb TMR). El kit viene en formato de 200 y 800 reacciones, recomendado la preparación de cuatro estándares de 50, 2, 0,08 y 0,0032 ng/μl [46]. Es capaz de detectar ADN de hasta 0,5 pg/μl [47], y la casa comercial promete un kit con un verdadero valor cero con el que no se obtendrá amplificación, lo que parece ser cierto en comparación con otros kits de qPCR [48].

El kit ha sido probado en aplicaciones de ADN antiguo mostrando un buen rendimiento, viéndose que no se obtiene un perfil con índices de degradación superiores a 10 [49], y está referido en diversos estudios de ADN en restos óseos antiguos [50,51], apuntándose su valor como predictor para la obtención o no de un perfil de ADN en restos óseos antiguos.

Investigator Quantiplex (QIAGEN)

Los kits de la línea Investigator Quantiplex de QIAGEN detectan mediante química Taqman® ADN intacto e inhibidores, estando disponibles kits para ADN humano o ADN humano y ADN humano masculino. El kit Quantiplex tiene una diana de ADN humano de 146 pb y un IPC de 200 pb. El kit Quantiplex HYres añade una diana humana masculina de 129 pb. Por su parte, el kit Quantiplex Pro presenta una diana de ADN humano pequeña (91 pb) y otra mayor (353 pb), una diana de ADN humano masculino (81 pb), y un IPC más sensible a inhibidores (434 pb). El kit Quantiplex Pro RGQ añade una diana masculina mayor (359 pb) [52]. Todos los kits se presentan en un formato de 200 reacciones.

Todos ellos han mostrado un buen desempeño a la hora de cuantificar ADN de restos óseos antiguos, desde el kit Quantiplex [53] al Quantiplex Pro RGQ, con un límite de detección de 4 pg, se muestra como un kit especialmente eficiente para la determinación del sexo de la muestra, así como de la viabilidad de continuación de los análisis de STRs en muestras de ADN antiguo, si bien parece ser necesario cuantificar varios extractos de la muestra para obtener información más precisa [54].

InnoQuant® HY (InnoGenomics)

El kit InnoQuant® HY utiliza tecnología Taqman® para detectar un fragmento corto de diana Alu (80 pb), una diana más larga de SINE-VNTR-Alus (207 pb), una diana de ADN humano masculino (80 pb) y un IPC (172 pb), siendo capaz de detectar menos de 1 pg de ADN [55].

El kit aparece pocas veces en la literatura, y no hay estudios que lo validen para su uso en ADN antiguo. Un estudio utiliza un hueso degradado junto con otros tipos de muestras [56], y otro emplea diversas muestras de dientes frescos obtenidos en sujetos vivos [57].

2.5. Otros métodos de cuantificación

Pese a que la qPCR sea la técnica estrella a la hora de la cuantificación del extracto de ADN, hay diferentes e interesantes alternativas a esta técnica, como son la PCR de punto final (*endpoint* qPCR), la PCR digital (dPCR) y las posibilidades ofrecidas por la secuenciación de nueva generación (NGS).

2.5.1. PCR de punto final

En la PCR de punto final la concentración de ADN inicial se calcula con un análisis estadístico siguiendo una distribución de Poisson del número de reacciones positivas (aquellas que contienen el amplificado diana) y negativas (en las que no se ha detectado amplificado) [58]. Bajo esta técnica se han desarrollado métodos de cuantificación de ADN genómico utilizando secuencias *Alu* y cebadores marcados con un fluoróforo, detectando hasta 2,5 pg de ADN [59], mientras que otros amplifican el marcador TH01 y detección mediante PicoGreen® [60].

El principal problema de la PCR de punto final es que en general las mediciones se hacen a partir de un número prefijado de ciclos, momento a partir del cual la reacción está más allá de la fase exponencial y alguno de sus componentes actúa como factor limitante. Por ende, puede haber una gran variación en la cantidad final de amplicones entre réplicas con la misma cantidad inicial de ADN, y es que la correlación lineal entre la cantidad de amplicones y la cantidad inicial de ADN molde es de únicamente uno o dos órdenes de magnitud [24].

2.5.2. PCR digital

La PCR digital (dPCR) permite detectar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos proporcionando resultados fiables de cuantificación. La mayoría de instrumentos de dPCR se basan en distribuciones de Poisson para hacer los cálculos de cuantificación, en combinación con sondas fluorescentes y diluciones de ADN para determinar estadísticamente los resultados obtenidos en muestra con una o incluso ninguna moléculas previamente a la amplificación [61], lo que explicaría el éxito de esta metodología en este sentido. Es por ello que está ampliamente extendido su uso debido a su gran sensibilidad y precisión. Esta tecnología proporciona nuevos métodos para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos, contemplándose como una alternativa a la qPCR, especialmente para la detección de alelos raros. El fundamento de la técnica es la división de las muestras de ADN en múltiples reacciones de PCR individuales, lo que aumenta la probabilidad de que sea una sola la molécula que vaya a amplificarse millones de veces. El uso de chips de nano fluidos permite, además, poder hacer cientos de reacciones de PCR en paralelo [62].

La mayoría de las aplicaciones de la dPCR se encuentran en campos biomédicos, como es la detección de mutaciones raras, detección de patógenos, estudios de anomalías cromosómicas, localización de ADN tumoral en biopsias líquidas o diagnósticos prenatales [63]. En el campo forense, en el que cualquier pequeña cantidad de ADN es extremadamente valiosa para la investigación, la PCR digital puede ser una herramienta muy prometedora, teniendo como único reto la eliminación de inhibidores [64] de cara a la amplificación. Sin embargo, hay pocos ejemplos de utilización de esta técnica en la literatura. La dPCR se ha visto especialmente útil para la determinación de plásmidos de ADN, siendo sensible a la pérdida de ADN causada por degradación o adsorción, determinaciones que resultarían útiles en contextos forenses [65]. En los casos de deleciones poco frecuentes de ADN mitocondrial, la PCR digital podría ser también utilizada como método de detección [66]. Esta técnica parece estar menos afectada por la acción de inhibidores debido a la utilización de medidas de punto final, lo que elimina esa subordinación a la cinética de amplificación. La división de las muestras es otro factor a considerar, teniendo en cuenta que cabría esperar una menor interacción entre las moléculas durante la polimerización, incluyendo los inhibidores [67].

2.5.3. Cuantificación de librerías en NGS

Aunque más adelante desarrollaremos la secuenciación de ADN con técnicas de secuenciación masiva, es menester mencionar que la qPCR se utiliza para la comprobación del éxito en la generación de librerías a partir de una muestra de ADN, así como para la normalización de las mismas. Para ello hay diferentes opciones comerciales disponibles, como son Ion Library Taqman™ Quantification Kit (ThermoFisher) [68], PowerSeq® Quant MS System (Promega) [69], o KAPA Library Quantification Kit (Roche) [70]. Hay laboratorios que no determinan la concentración de librerías por esta técnica, sino por fluorimetría, utilizando equipos como Qubit [71].

2.5.4. Cuantificación de ADN mitocondrial

Hoy en día no hay disponibles kits comerciales para cuantificación de ADN mitocondrial humano, salvo algunas soluciones creadas por NovaQuant y ScienCell (MilliporeSigma™ Novagen™ NovaQUANT™ Human Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit y Absolute Human Mitochondrial DNA Copy Number Quantification qPCR Assay Kit), kits que lo que hacen es inferir la cantidad de ADN mitocondrial en función de una cuantificación simultánea de ADN nuclear. El primer ensayo de qPCR que cuantificaba ADN mitocondrial utilizó una diana de 142 pb del gen tRNA lisina sintetasa, pudiendo detectar una única molécula de ADN mitocondrial, siendo un mínimo de 80 copias el necesario para obtener resultados de secuenciación [72]. Otros ensayos utilizaron dos amplicones de diferente tamaño, por ejemplo, de 113 pb y 127 pb en la región HV1 [23], de manera que se podía estimar el estado de degradación de este material genético de herencia materna. A este respecto se han utilizado muchas dianas diferentes: ND1

[73], ND4 [74], ND5 [75], RB1 [76], 16S [77], chrM [78] o tRNA lisina y ATP sintetasa 8 [24], así como regiones no codificantes como HV1 [24], HV2 [72] y HV3 [74].

Incluso se ha llegado a proponer un ensayo cuádruple de qPCR amplificando al mismo tiempo ADN nuclear y mitocondrial utilizando dianas para RB1 de 95 pb, el cromosoma Y de 126 pb, ATPasa8 del mitocondrial de 96 pares de bases y un IPC, lo que permitiría determinar en un único ensayo el estado del ADN nuclear, del mitocondrial, así como la posible presencia de inhibidores en la muestra [79], echándose únicamente de menos la posibilidad de determinar, a su vez, el estado de degradación del ADN mitocondrial, para así poder establecer la mejor estrategia de amplificación en función del estado de la muestra. En esta vía encontramos también en la literatura ensayos que permiten inferir el estado de degradación del mtDNA, como es el caso de un estudio que toma como dianas el 16S rRNA [75], o bien encontramos la combinación de una diana de 70 pb de ADN nuclear con otras dos de 69 y 143 pb de ADN mitocondrial [80].

Las heteroplasmias también han sido objeto de estudio con la finalidad de determinar la proporción de heteroplasmia en una muestra dada o bien prever la presencia de heteroplasmias en muestras degradadas, detectándose una fuerte correlación entre muestras mínimas y de referencia en un mismo sujeto donante [73].

3. Experimento #3. Comparativa de cuatro kits de qPCR en la cuantificación de ADN de muestras críticas

El objetivo de esta investigación es comparar la eficiencia de cuatro kits de cuantificación mediante PCR a tiempo real (Quantifiler™ Trio, PowerQuant®, Investigator® Quantiplex® Pro e InnoQuant® HY Fast) en 62 muestras de restos humanos procedentes de fosas comunes. Este ensayo cuenta con una publicación en la revista *Forensic Science International*:

Haarkötter, C., Saiz, M., Gálvez, X., Vinueza-Espinosa, D. C., Medina-Lozano, M. I., Lorente, J. A., & Álvarez, J. C. (2023). Performance comparison of four qPCR and three autosomal STR commercial kits from degraded skeletal remains. En *Forensic Science International* (Vol. 353, p. 111856). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111856>

3.1. Material y métodos

Todos los pasos de descontaminación, extracción, y cuantificación se llevaron a cabo en un laboratorio dedicado a muestras mínimas, siguiendo las recomendaciones internacionales de trabajo con ADN antiguo [81–83].

Preparación de las muestras

Se analizaron un total de 62 muestras (véase la **Tabla 4**) de hueso petroso, fémur, tibia y diente, de restos humanos de fosas de la Guerra Civil y la Posguerra españolas. Las muestras proceden de la región de Andalucía, caracterizada por un suelo de pH ácido [84], y temperaturas de hasta 45 °C en verano [85].

Tabla 4. Muestras analizadas

Muestra	Diente	Tibia	Fémur	Petroso	Total
N	5	10	12	35	62

La superficie de las muestras fue lijada con una herramienta rotatoria Dremel® [86], cortándose los huesos en fragmentos de 0,5-1 cm, exponiéndose tanto estos como los dientes a luz UV en una cabina de 6W durante 10 minutos a cada lado [87]. Las muestras se pulverizaron en un equipo Tissueyser II (QIAGEN), en dos ciclos de 30 Hz de 30 segundos de duración cada uno.

Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo siguiendo un protocolo interno basado en la extracción orgánica [88]. A 1,0 gramos de pulverizado se le añadió 5 ml de tampón de extracción (4125 µl de EDTA 0,5M, 300 µl de SDS al 10%, 375 µl de proteinasa K a 10 mg/ml, y 200 µl de DTT 1M), incubándose a 56°C durante la noche. El lisado fue centrifugado y se le añadieron 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), transfiriéndose el sobrenadante a un Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit 30 kDa (Merck KGaA), concentrándose tras dos lavados con agua

destilada esterilizada. El extracto fue purificado con columnas QIAquick, a un volumen final de 75 µl.

Cuantificación de ADN

Se probaron cuatro kits de qPCR: Quantifiler™ Trio (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), PowerQuant® System (Promega Corporation, Madison WI, USA), Investigator® Quantiplex® Pro (QIAGEN, Hilden, Alemania), e InnoQuant® HY Fast (InnoGenomics Technologies, Nueva Orleans, LA, USA). Las reacciones de cuantificación se prepararon siguiendo las recomendaciones de cada fabricante [38,55,89,90], requiriendo todos los kits de cuantificación el mismo volumen de ADN para la reacción (2 µl). Los ensayos de qPCR se realizaron en un equipo QuantStudio™ 5 System (ThermoFisher).

Se estudiaron cinco parámetros: (1) cantidad de ADN detectado con la diana corta, (2) cantidad de ADN detectado con la diana larga, (3), cantidad de ADN masculino, (4) índice de degradación calculado como la ratio entre las dianas corta y larga, y (5) la presencia o ausencia de inhibición determinada por la comparación entre la media del valor del ciclo umbral de los estándares de la reacción *versus* la observada en las muestras (dos o más unidades por encima se establecieron como presencia de inhibición).

Teniendo en cuenta que los kits de cuantificación tienen un tamaño de diana larga diferente, se calculó otro parámetro para hacer comparativos los índices de degradación observados entre las muestras, utilizándose para ello la fórmula de Hansson, Egeland & Hill [91]:

$$P(\text{deg}) = 1 - e^{\frac{\ln(c(x2)) - \ln(c(x1))}{x2 - x1}}$$

Siendo x1 la diana corta y x2 la diana larga.

Análisis de datos

Los datos de cuantificación se analizaron con los programas HID Real-Time PCR Analysis Software v1.3 y QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1. El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó con jamovi 2.2.5 [92].

3.2. Resultados y discusión

Los resultados de cuantificación para todas las dianas (media aritmética y coeficiente de variación cuartílico, CQV, se muestran en la **Tabla 5** y en la **Figura 11**. En la **Figura 12** se muestran los resultados por muestra. InnoQant® HY fue el kit más sensible, detectando en promedio 1,015 ng/µl de ADN de la diana corta, mientras que Quantifiler™ Trio y PowerQuant® detectaron 0,432 ng/µl y 0,382 ng/µl respectivamente. Quantiplex® Pro fue el menos sensible, detectando en promedio 0,296 ng/µl. La misma tendencia se observa con respecto a la diana grande, detectando

InnoQuant® HY Fast en promedio 0,046 ng/μl, Quantifiler™ Trio 0,022 ng/μl, PowerQuant® 0,002 ng/μl y Quantiplex® Pro 0,005 ng/μl. Quantiplex® Pro fue el kit con mayor número de casos perdidos en la diana larga (19), seguido por PowerQuant® (12), presumiblemente debido a la mayor longitud de la misma en estos dos kits. InnoQuant® HY Fast no tuvo ningún caso perdido para este parámetro, teniendo Quantifiler™ Trio sólo uno.

Tabla 5. Promedio de los parámetros de cuantificación analizados y coeficiente de variación cuartílico (CQV) por kit de qPCR

	Quantifiler™ Trio	PowerQuant®	Investigator® Quantiplex® Pro	InnoQuant® HY Fast
Corto (ng/μL)	0.432	0.382	0.296	1.015
CQV	0.928	0.919	0.901	0.950
Largo (ng/μL)	0.022	0.004	0.005	0.046
CQV	0.834	0.773	0.885	0.836
Masculino (ng/μL)	0.338	0.132	0.310	0.327
CQV	0.948	0.911	0.950	0.920
DI	47	233	80	37
CQV	0.79	0.89	0.60	0.71
P(deg)	0.00246	0.00208	0.00262	0.00110
CQV	0.75883	0.84960	0.72780	1.67570

Curiosamente, los valores promedio con respecto a la diana masculina son bastante similares entre los kits InnoQuant® HY Fast (0,327 ng/μl), Quantifiler™ Trio (0,338 ng/μl) y Quantiplex® Pro (0,310 ng/μl), siendo el kit PowerQuant® el menos sensible para este parámetro 0,132 ng/μl). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en una prueba Post-Hoc de Tukey entre InnoQuant® HY Fast y el resto de kits para las dianas corta y larga (p-valor<0,001), pero no para la diana masculina.

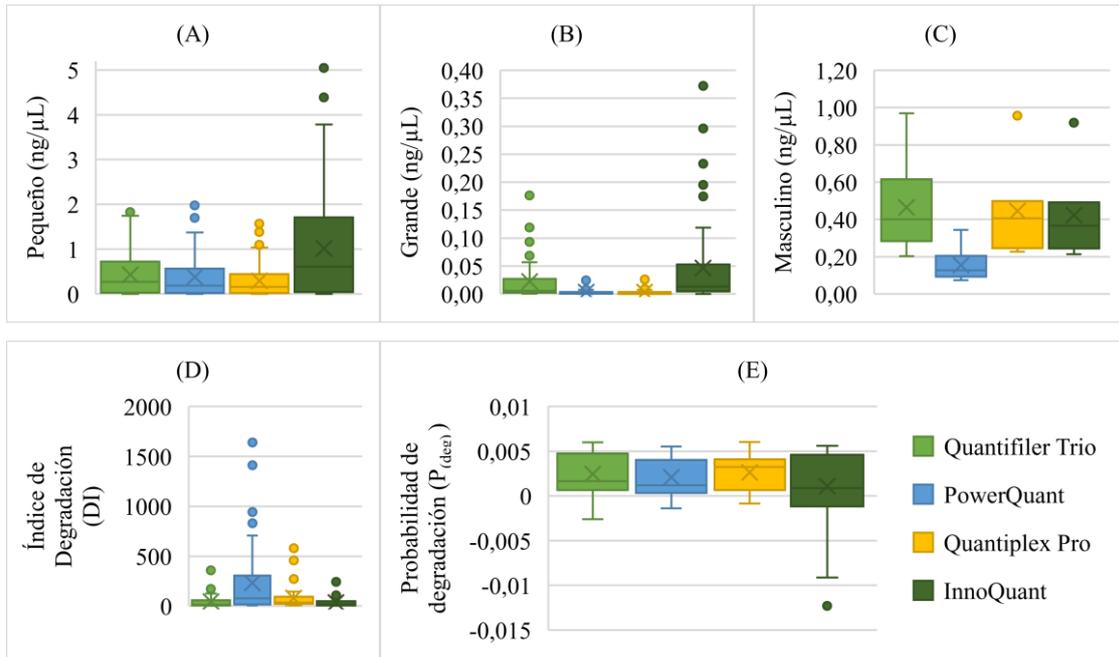


Figura 11. Diagramas de caja de los valores de cuantificación de las dianas pequeña (A), grande (B), masculina (C), índice de degradación (D) y probabilidad de degradación [P(deg)] por kit

PowerQuant[®] detectó los valores de degradación más altos (233 en promedio), seguido por Quantiplex[®] Pro (80), Quantifiler[™] Trio (47), e InnoQuant[®] HY Fast (37). Sin embargo, estas medidas no son comparables entre los kits teniendo en cuenta la sensible diferencia existente entre sus dianas de mayor tamaño. Con la corrección que nos da el parámetro de probabilidad de degradación [P(deg)], todos los kits dan aproximadamente los mismos valores, lo que no deja de ser interesante teniendo en cuenta que son las mismas muestras las que se están analizando con los cuatro kits comerciales, no habiendo diferencias significativas entre ellos en un ANOVA de Welch.

El coeficiente de variación cuartílico sugiere que todos los kits tienen aproximadamente el mismo grado de dispersión en todos los parámetros, lo que también era esperable teniendo en cuenta que es el mismo lote de muestras el que se está analizando. Finalmente, no se observó inhibición en ninguna de las muestras ni en ninguno de los kits comerciales.

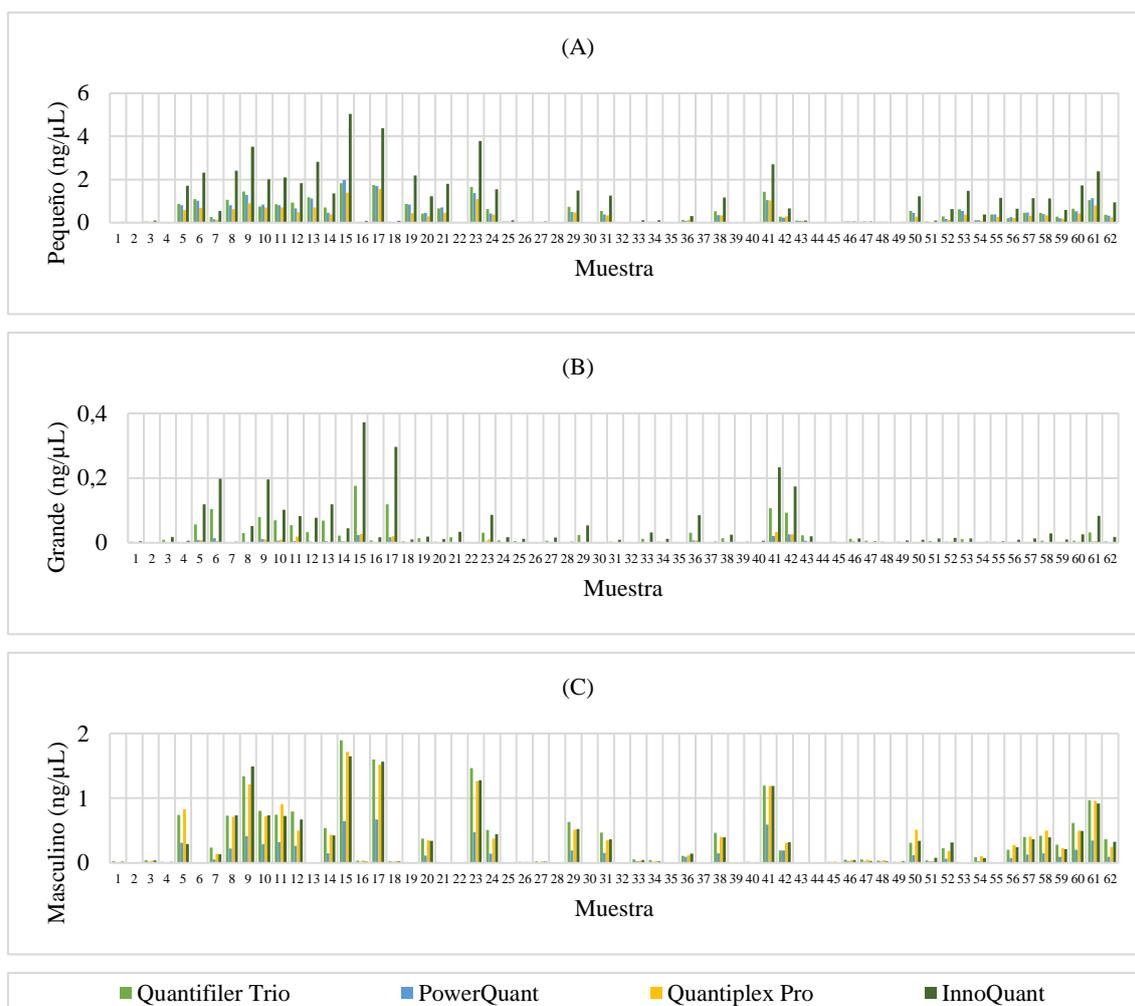


Figura 12. Gráficos de barra de los resultados de cuantificación por muestra: diana pequeña (A), diana grande (B), y diana masculina (C). En general, las muestras se comportan igual en los distintos kits

Un estudio anterior con 5 muestras de restos óseos resultó en InnoQuant[®] HY Fast siendo el kit más sensible, seguido por PowerQuant[®], Quantiplex[®] Pro y Quantifiler[™] Trio [93,94], lo cual es consistente con los resultados de nuestro estudio. El estudio citado también encuentra que el kit de QIAGEN tiene el mayor índice de degradación entre los diferentes kits, mientras que Quantifiler[™] Trio tiene la menor, lo que los autores explican por la diferencia de tamaño entre ambas dianas de 140 pb aproximadamente [93,94]. Este hecho subraya la necesidad de disponer de un parámetro que sea independiente a los tamaños de amplicón, como es la P(deg).

Otro estudio realizado con muestras de control de ADN genómico extraído de sangre y muestras degradadas artificialmente que comparaba Quantiplex[®] HYres, PowerQuant[®] y Quantifiler[™] Trio encuentra valores de cuantificación ligeramente mayores con PowerQuant[®] que con Quantifiler[™] Trio [95]. Nuestro estudio llega a la conclusión opuesta, teniendo Quantifiler[™] Trio una mayor sensibilidad que el kit de Promega con las muestras analizadas.

Finalmente, otros autores compararon los índices de degradación de InnoQuant[®] HY y Quantifiler[™] Trio, teniendo en cuenta que los tamaños de las dianas son similares, en huellas

dactilares reveladas con cierta antigüedad, encontrándose valores de degradación más altos en el primero que en el segundo. Si bien es cierto que este hallazgo puede explicarse por la mayor sensibilidad observada en InnoQuant® HY Fast, nuestro estudio tuvo los mismos resultados con los índices de degradación en bruto, lo cual fue corregido al calcularse la P(deg).

En resumen, nuestra investigación es consistente con los hallazgos anteriores, indicando que InnoQuant® HY Fast es un kit especialmente sensible al compararlo con el resto de opciones comerciales en cuanto a la cuantificación de restos humanos críticos.

4. Conclusiones

Los resultados de cuantificación obtenidos sugieren que el kit InnoQuant® HY Fast es el más sensible, teniendo el resto de kits un comportamiento similar con las 62 muestras analizadas. Este hallazgo es consistente con la literatura científica disponible sobre el tema. Finalmente, se ha visto la utilidad del parámetro de probabilidad de degradación [P(deg)] para hacer comparativas del estado de las muestras que se han analizado con diferentes kits comerciales al no depender del tamaño de las diferentes dianas para su cálculo.

5. Referencias

- [1] Federal Bureau Investigation, Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories, Forensic Science Communications. 2 (2000).
- [2] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories, 2017.
- [3] J.M. Butler, Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology, Academic Press, San Diego, 2011.
- [4] Á. Carracedo, ed., Forensic DNA Typing, Humana Press, Totawa, New Jersey, 2005.
- [5] J.A. Nicklas, E. Buel, Quantification of DNA in forensic samples, Analytical and Bioanalytical Chemistry. 376 (2003) 1160–1167.
- [6] S.B. Lee, B. McCord, E. Buel, Advances in forensic DNA quantification: A review, Electrophoresis. 35 (2015) 3044–3052. <https://doi.org/10.1002/elps.201400187>.
- [7] L.M. Misner, A.C. Halvorson, J.L. Dreier, D.H. Ubelaker, D.R. Foran, The Correlation Between Skeletal Weathering and DNA Quality and Quantity*, Journal of Forensic Sciences. 54 (2009) 822–828. <https://doi.org/10.1111/J.1556-4029.2009.01043.X>.
- [8] L. Rubio, J.M. Sioli, M.J.M.J. Gaitán, S. Martín-de-las-Heras, Dental color measurement to predict DNA concentration in incinerated teeth for human identification, PLoS One. 13 (2018) e0196305. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0196305>.
- [9] N. Laurin, A. DeMoors, C. Frégeau, Performance of Identifiler Direct and PowerPlex 16 HS on the Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer for processing biological samples archived on FTA cards, Forensic Science International: Genetics. 6 (2012) 621–629. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2012.02.003>.
- [10] A. Mundorff, J.M. Davoren, Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals, Forensic Science International: Genetics. 8 (2014) 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2013.08.001>.
- [11] A. Miloš, A. Selmanović, L. Smajlović, R.L.M. Huel, A.R. Cheryl Katzmarzyk, T.J. Parsons, Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements, Croatian Medical Journal. 48 (2007) 486–493.
- [12] C. Lassen, S. Hummel, B. Herrmann, Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue, 107 (1994) 152–155. <https://doi.org/10.1007/BF01225603>.
- [13] B. Budowle, J. Smith, T. Moretti, J. DiZinno, DNA TYPING PROTOCOLS: Molecular Biology and Forensic Analysis, Eaton Publishing, Natrick, 2000.
- [14] S.R. Gallagher, Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy, Current Protocols in Immunology. 2017 (2017) A.3L.1-A.3L.14. <https://doi.org/10.1002/CPIM.20>.
- [15] V.L. Singer, L.J. Jones, S.T. Yue, R.P. Haugland, Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation, Analytical Biochemistry. 249 (1997) 228–238.
- [16] R. Brzobohatá, K., Drozdová, E., Smutný, J., Zeman, T., & Beňuš, Comparison of Suitability of the Most Common Ancient DNA Quantification Methods, Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 21 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0197>.
- [17] C.D. Georgiou, I. Papapostolou, Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA, Analytical Biochemistry. 358 (2006) 247–256. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2006.07.035>.
- [18] M.R. Green, J. Sambrook, Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis, in: Cold Spring Harbor Protocols, 2019: pp. 6–15. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>.
- [19] E. Hagelberg, L.S. Bell, T. Allen, A. Boyde, S.J. Jones, J.B. Clegg, Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications The analysis of DNA from ancient bone, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 333 (1991) 399–407. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0090>.
- [20] P.S. Walsh, J. Varlaro, R. Reynolds, A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA, Nucleic Acids Research. 20 (1992) 5061–5065. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5061>.
- [21] Applied Biosystems, QuantiBlot® Human DNA Quantitation Kit, Product Bulletin. (2004). https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_040281.pdf.
- [22] A. Alonso, Š. Anđelinoviæ, P. Martín, D. Sutloviæ, I. Erceg, E. Huffine, L. Fernández de Simón, C. Albarrán, M. Definis-Gojanoviæ, A. Fernández-Rodríguez, P. García, I. Drmiæ, B. Rezić, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples, Croatian Medical Journal. 42 (2001) 260–266.
- [23] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, Ó. García, L. Fernández de Simón, J. García-Hirschfeld, M. Sancho, C. de la Rúa, J. Fernández-Piqueras, Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, Forensic Science International. 139 (2004) 141–149.

- [24] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, D. Primorac, O. García, L. Fernández de Simón, J. García-Hirschfeld, M. Sancho, J. Fernández-Piqueras, Specific Quantification of Human Genomes from Low Copy Number DNA Samples in Forensic and Ancient DNA Studies, *Croatian Medical Journal*. 44 (2003) 273–280.
- [25] M.A. Batzer, P.L. Deininger, Alu repeats and human genomic diversity, *Nature Reviews Genetics*. 3 (2002) 370–379. <https://doi.org/10.1038/nrg798>.
- [26] M.N. Mandrekar, A.M. Erickson, K. Kopp, B.E. Krenke, P. V. Mandrekar, R. Nelson, K. Peterson, J. Shultz, A. Tereba, N. Westphal, Development of a Human DNA Quantitation System, *Croatian Medical Journal*. 42 (2001) 336–339.
- [27] Š. Anđelinoviae, D. Sutloviae, I.E. Ivkošiae, V. Škaro, A. Ivkošiae, F. Paiae, B. Reeciae, M. Definis-Gojanoviae, D. Primorac, Twelve-year Experience in Identification of Skeletal Remains from Mass Graves, (n.d.). www.cmj.hr (accessed July 22, 2021).
- [28] M. Bunce, C.L. Oskam, M.E. Alletoft, Quantitative Real-Time PCR in aDNA Research, in: B. Shapiro, M. Hofreiter (Eds.), *Ancient DNA Methods and Protocols*, Humana Press, New York, n.d.: pp. 121–133.
- [29] C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams, Real Time Quantitative PCR, *Genome Methods*. 6 (1996) 986–994.
- [30] D. Lucy, *Introduction to Statistics for Forensic Scientists*, Wiley, Chichester, 2005.
- [31] G.L. Shipley, An introduction to real-time PCR, in: M.T. Dorak (Ed.), *Real-Time PCR*, Taylor & Francis, Abingdon, 2007: pp. 1–39.
- [32] P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (1991) 7276–7280.
- [33] I. V. Kutyavin, I.A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E.A. Lukhtanov, E.S. Belousov, M.J. Singer, D.K. Walburger, S.G. Lokhov, A.A. Gall, R. Dempcy, M.W. Reed, R.B. Meyer, J. Hedgpeth, 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures, *Nucleic Acids Research*. 28 (2000) 655–661.
- [34] F. Ponchel, Real-time PCR using SYBR® Green, in: M.T. Dorak (Ed.), *Real-Time PCR*, Taylor & Francis, Abingdon, 2006: pp. 139–153.
- [35] BioCat, Real Time PCR Dyes, Genomics. (2009). <https://www.biocat.com/genomics/real-time-pcr-dyes> (accessed May 6, 2016).
- [36] J.A. Nicklas, E. Buel, Development of an Alu-based, Real-Time PCR Method for Quantitation of Human DNA in Forensic Samples, *Journal of Forensic Science*. 48 (2003) 1–9.
- [37] S. Giglio, P.T. Monis, C.P. Saint, Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR, *Nucleic Acids Research*. 31 (2003) e136.
- [38] Thermo Fisher Scientific, Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits, User Guide. (2018). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf> (accessed July 29, 2021).
- [39] C. Vieira-Silva, H. Afonso-Costa, T. Ribeiro, M.J. Porto, M. Dias, A. Amorim, Quantifiler® Trio DNA validation and usefulness in casework samples, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 5 (2015) e246–e247. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.098>.
- [40] S. Vernarecci, E. Ottaviani, A. Agostino, E. Mei, L. Calandro, P. Montagna, Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: A matter of degradation, *Forensic Science International: Genetics*. 16 (2015) 77–85.
- [41] N. Gouveia, P. Brito, V. Bogas, A. Serra, A.M. Bento, V. Lopes, F. Balsa, L. Sampaio, M. São Bento, P. Cunha, M.J. Porto, THE effect of different levels of degradation and DNA concentrations on the quality of genetic profiles, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 6 (2017) e428–e429. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.151>.
- [42] Q. Liu, L. Liu, M. Zhang, Q. Zhang, Q. Wang, X. Ding, L. Shao, Z. Zhou, S. Wang, A Simple and Efficient Method of Extracting DNA from Aged Bones and Teeth, *Journal of Forensic Sciences*. 63 (2018) 824–828. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13603>.
- [43] E. Pilli, S. Vai, M.G. Caruso, G. D'Errico, A. Berti, D. Caramelli, Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archeological bone samples via forensic approach, *Forensic Science International*. 283 (2018) 144–149.
- [44] M.V. Emery, K. Bolhofner, S. Winingear, R. Oldt, M. Montes, S. Kanthaswamy, J.E. Buikstra, L.C. Fulginiti, A.C. Stone, Reconstructing full and partial STR profiles from severely burned human remains using comparative ancient and forensic DNA extraction techniques, *Forensic Science International: Genetics*. 46 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2020.102272>.

- [45] A. Holt, S.C. Wootton, J.J. Mulero, P.M. Brzoska, E. Langit, R.K. Green, Developmental Validation of the Quantifiler™ HP and Trio Kits for Human DNA Quantification in Forensic Samples, *Forensic Science International: Genetics*. 21 (2015) 145–157.
- [46] Promega Corporation, PowerQuant® System, PowerQuant® System Technical Manual. (2019). <https://www.promega.es/products/forensic-dna-analysis-ce/human-specific-dna-quantitation/powerquant-system/?catNum=PQ5002>.
- [47] M.M. Ewing, J.M. Thompson, R.S. McLaren, V.M. Purpero, K.J. Thomas, P.A. Dobrowski, G.A. DeGroot, E.L. Romsos, D.R. Storts, Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant® System, *Forensic Science International: Genetics*. 23 (2016) 166–177.
- [48] M. Poetsch, H. Konrad, J. Helmus, T. Bajanowski, N. von Wurmb-Schwark, Does zero really mean nothing?—first experiences with the new PowerQuant™ system in comparison to established real-time quantification kits, *International Journal of Legal Medicine*. 130 (2016) 935–940. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1352-1>.
- [49] A.M. Pflugbeil, S. Groß, J. Rothe, F. Heinke, H. Bruchhaus, J. Edelmann, D. Labudde, J. Dreßler, K. Thiele, Initial experience in the application of the PowerQuant™ system and the Investigator® ESSplex SE QS kit for aDNA analysis, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 5 (2015) e420–e421. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.167>.
- [50] I. Zupanič Pajnič, T. Zupanc, J. Balazic, Ž.M. Geršak, O. Stojković, I. Skadrić, M. Črešnar, Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples, *Forensic Science International: Genetics*. 27 (2017) 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.004>.
- [51] Ž.M. Geršak, I. Zupanič Pajnič, M. Črešnar, T. Zupanc, Determination of DNA yield rates in six different skeletal elements in ancient bones, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 7 (2019) 120–122. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.047>.
- [52] QIAGEN, Investigator Quantiplex Kits, (2018). <https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/human-dna-quantification/investigator-quantiplex-kits/>.
- [53] T. Zupanc, J. Balazic, B. Stefanic, I. Zupanic Pajnic, Performance of the Human Quantifiler, the Investigator Quantiplex and the Investigator ESSplex plus kit for quantification and nuclear DNA typing of old skeletal remains, *Romanian Journal of Legal Medicine*. 21 (2013) 119–124. <https://doi.org/10.4323/rjlm.2013.119>.
- [54] J. Morrison, S. McColl, J. Louhelainen, K. Sheppard, A. May, L. Girdland-Flink, G. Watts, N. Dawnay, Assessing the performance of quantity and quality metrics using the QIAGEN Investigator® Quantiplex® pro RGQ kit, *Science and Justice*. 60 (2020) 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2020.03.002>.
- [55] InnoGenomics, InnoQuant® HY, (2016). <https://innogenomics.com/products/innoquant-hy/> (accessed October 28, 2021).
- [56] A. Loftus, G. Murphy, H. Brown, A. Montgomery, J. Tabak, J. Baus, M. Carroll, A. Green, S. Sikka, S. Sinha, Development and validation of InnoQuant® HY, a system for quantitation and quality assessment of total human and male DNA using high copy targets, *Forensic Science International: Genetics*. 29 (2017) 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.009>.
- [57] P. Carrasco, C. Inostroza, M. Didier, M. Godoy, C.L. Holt, J. Tabak, A. Loftus, Optimizing DNA recovery and forensic typing of degraded blood and dental remains using a specialized extraction method, comprehensive qPCR sample characterization, and massively parallel sequencing, *International Journal of Legal Medicine*. 134 (2020) 79–91. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02124-y>.
- [58] C.M. Hindson, J.R. Chevillet, H.A. Briggs, E.N. Gallichotte, I.K. Ruf, B.J. Hindson, R.L. Vessella, M. Tewari, Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR, *Nature Methods*. 10 (2013) 1003–1005. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2633>.
- [59] M. Sifis, K. Both, L. Burgoyne, A More Sensitive Method for the Quantitation of Genomic DNA by Alu Amplification, *Journal of Forensic Sciences*. 47 (2002) 589–592. <https://doi.org/10.1520/jfs15299j>.
- [60] J.W. Schumm, C.A. Cave, J.C. Fox, A RAPID SEMI-AUTOMATED METHOD FOR HUMAN-SPECIFIC DNA QUANTIFICATION, 12th International Symposium on Human Identification Poster Abstracts. (n.d.).
- [61] P.-L. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes, dPCR: A Technology Review, *Sensors (Basel)*. 18 (2018) 1271.
- [62] Thermo Fisher Scientific, Digital PCR, Polymerase Chain Reaction (PCR). (2014). <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/digital-pcr.html> (accessed June 30, 2021).

- [63] L. Cao, X. Cui, J. Hu, Z. Li, J.R. Choi, Q. Yang, M. Lin, L.Y. Hui, F. Xu, Advances in Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) and Its Emerging Biomedical Applications, *Biosens Bioelectron.* 90 (2017) 459–474.
- [64] M. Sidstedt, C.R. Steffen, K.M. Kiesler, P.M. Vallone, P. Rådström, J. Hedman, The impact of common PCR inhibitors on forensic MPS analysis, *Forensic Science International: Genetics.* 40 (2019) 182–191.
- [65] Y. Wang, M. Keith, A. Leyme, S. Bergelson, M. Feschenko, Monitoring Long-Term DNA Storage via Absolute Copy Number Quantification by ddPCR, *Anal Biochem.* 583 (2019) 113363.
- [66] P. Manoj, Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas, *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 27 (2016) 742–746.
- [67] M. Sidstedt, P. Rådström, J. Hedman, PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 412 (2020) 2009–2023.
- [68] ThermoFisher Scientific, Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit USER GUIDE, (2022). https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0015802_IonLibrary_Taqman_Quantitation_Kit_UG.pdf.
- [69] Promega, PowerSeq™ Quant MS System Technical Manual, (2020). https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/tm511-powerseq-quant-ms-system-protocol.pdf?rev=c2a8dc4a9b574ca788b3a40fdcf33d0&sc_lang=en.
- [70] KAPABIOSYSTEMS, KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms, (2020). <https://rochesequencingstore.com/wp-content/uploads/2017/10/KAPA-Library-Quantification-Kit.pdf>.
- [71] Invitrogen, Understanding library quantification assays for next-generation sequencing applications, (2019). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/library-quantification-assays-sequencing-applications-technical-note.pdf>.
- [72] H. Andréasson, U. Gyllensten, M. Allen, Real-Time DNA Quantification of Nuclear and Mitochondrial DNA in Forensic Analysis, *BioTechniques.* 33 (2002) 402–411.
- [73] J.M. Gallimore, J.A. McElhoe, M.M. Holland, Assessing heteroplasmic variant drift in the mtDNA control region of human hairs using an MPS approach, *Forensic Science International: Genetics.* 32 (2018) 7–17.
- [74] N.R. Phillips, M.L. Sprouse, R.K. Roby, Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay, *Scientific Reports.* 4 (2014) 1–7.
- [75] M.F. Kavlick, Development of a triplex mtDNA qPCR assay to assess quantification, degradation, inhibition, and amplification target copy numbers, *Mitochondrion.* 46 (2019) 41–50.
- [76] H. Niederstätter, S. Köchl, P. Grubweiser, M. Pavlic, M. Steinlechner, W. Parson, A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA, *Forensic Science International: Genetics.* 1 (2007) 29–34.
- [77] R. Fregel, M. Almeida, E. Betancor, N.M. Suárez, J. Pestano, Reliable nuclear and mitochondrial DNA quantification for low copy number and degraded forensic samples, *Forensic Science International: Genetics Supplement. Series 3* (2011) e303–e304.
- [78] P. Refinetti, D. Warren, S. Morgenthaler, P.O. Ekstrøm, Quantifying mitochondrial DNA copy number using robust regression to interpret real time PCR results, *BMC Res Notes.* 10 (2017) E1–E7.
- [79] M.R. Whittle, D.R. Sumita, Quadruplex real-time PCR for forensic DNA quantitation, *Forensic Science International: Genetics Supplement.* (2008) 86–88.
- [80] C. Xavier, M. Eduardoff, C. Strobl, W. Parsons, SD quants-Sensitive detection tetraplex-system for nuclear and mitochondrial DNA quantification and degradation inference, *Forensic Science International: Genetics.* 42 (2019) 39–44.
- [81] A. Cooper, H. Poinar, Ancient DNA: Do It Right or Not at All, *Science.* 289 (2000) 1139.
- [82] R.E. Green, A.W. Briggs, J. Krause, K. Prüfer, H.A. Burbano, M. Siebauer, M. Lachmann, S. Pääbo, The Neandertal genome and ancient DNA authenticity, *EMBO Journal.* 28 (2009) 2494–2502. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.222>.
- [83] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic Analyses from Ancient DNA, *Annual Review of Genetics.* 38 (2004) 645–679.
- [84] Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, “Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación,” (1999). <https://www.ugr.es/~fjmartin/INFORMES/Criterios%20y%20estandares.pdf>.

- [85] Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul de la Junta de Andalucía, Caracterización media de las principales variables climáticas en Andalucía, (2022). https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/areas-tematicas/cambio-climatico-y-clima/clima-en-andalucia/caracterizacion_media_principales_variables_climaticas_andalucia.
- [86] D. Marjanović, A. Durmić-Pašić, N. Bakal, S. Haverić, B. Kalamujić, L. Kovačević, J. Ramić, N. Pojskić, V. Škaro, P. Projić, K. Bajrović, R. Hadžiselimović, K. Drobnić, E. Huffine, J. Davoren, D. Primorac, DNA Identification of Skeletal Remains from World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia Forensic Science Forensic Science, Croatian Medical Journal. 48 (2007) 513–519.
- [87] S.W. Carlyle, R.L. Parr, M.G. Hayes, D.H. O'Rourke, Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest, American Journal of Physical Anthropology. 113 (2000) 85–101.
- [88] M.N. Hochmeister, B. Budowle, Urs.V. Borer, U. Eggmann, C.T. Comey, R. Dirnhofer, Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains, Journal of Forensic Sciences. 36 (1991) 1649–1661. <https://doi.org/10.1520/JFS13189J>.
- [89] Promega Corporation, PowerQuant® System, PowerQuant® System Technical Manual. (2019). <https://www.promega.es/products/forensic-dna-analysis-ce/human-specific-dna-quantitation/powerquant-system/?catNum=PQ5002>.
- [90] QIAGEN, Investigator® Quantiplex® Pro Handbook, (2018). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=901fab34-fae8-4247-bc24-057840b27c50&lang=en>.
- [91] O. Hansson, T. Egeland, P. Gill, Characterization of degradation and heterozygote balance by simulation of the forensic DNA analysis process, Int J Legal Med. 131 (2017) 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1453-x>.
- [92] The jamovi project, jamovi (Version 2.2.5), (2021). <https://www.jamovi.org> (accessed July 5, 2022).
- [93] A.S. Holmes, R. Houston, K. Elwick, D. Gangitano, S. Hughes-Stamm, Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples, Int J Legal Med. 132 (2018) 691–701. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1745-9>.
- [94] A.S. Holmes, R. Houston, K. Elwick, D. Gangitano, S. Hughes-Stamm, Comparison of four commercial qPCR kits for analyzing inhibited and degraded forensic samples, QIAGEN Application Note. (n.d.). <https://annardx.com/wp-content/uploads/Comparison-of-4-commercial-qPCR-kits-for-analyzing-inhibited-and-degraded-forensic-samples.pdf>.
- [95] S. Lin, C. Li, S.C.Y. Ip, A performance study on three qPCR quantification kits and their compatibilities with the 6-dye DNA profiling systems, Forensic Science International: Genetics. 33 (2018) 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.016>.

6. Anexo. Material suplementario

	Quantifiler™ Trio				PowerQuant®				Quantiplex® Pro				InnoQuant® HY			
	Small	Large	Male	DI	Small	Large	Male	DI	Small	Large	Male	DI	Small	Large	Male	DI
1	0,026	0,003	0,024	9	0,013	0,000	0,007	42	0,016	0,000	0,013	50	0,040	0,005	0,022	8
2	0,002	0,000		7	0,004				0,002				0,009	0,000		18
3	0,049	0,009	0,040	5	0,041	0,001	0,018	29	0,039	0,001	0,036	34	0,097	0,018	0,039	5
4	0,012	0,003	0,013	5	0,012	0,001	0,006	12	0,012	0,001	0,012	22	0,030	0,006	0,015	5
5	0,866	0,057	0,743	15	0,806	0,008	0,310	100	0,583	0,009	0,829	67	1,706	0,119	0,294	14
6	1,091	0,104		10	1,025	0,014		72	0,694	0,005		135	2,326	0,198		12
7	0,260	0,001	0,236	360	0,153		0,054		0,127		0,137		0,537	0,004	0,135	142
8	1,067	0,030	0,730	35	0,814	0,002	0,224	349	0,627		0,710		2,403	0,052	0,735	46
9	1,446	0,079	1,338	18	1,280	0,012	0,417	110	0,897	0,010	1,214	90	3,521	0,195	1,492	18
10	0,752	0,069	0,805	11	0,844	0,006	0,291	139	0,706	0,009	0,722	78	2,011	0,103	0,733	20
11	0,856	0,055	0,747	16	0,804	0,005	0,319	157	0,710	0,019	0,908	37	2,100	0,082	0,727	26
12	0,934	0,033	0,795	28	0,660	0,004	0,262	173	0,487		0,501		1,831	0,077	0,673	24
13	1,181	0,068	0,000	17	1,123	0,006	0,000	203	0,701	0,001	0,000	582	2,817	0,119	0,001	24
14	0,714	0,022	0,537	32	0,448	0,004	0,151	113	0,388	0,004	0,436	93	1,365	0,045	0,427	30
15	1,824	0,176	1,896	10	1,980	0,024	0,645	81	1,384	0,027	1,717	51	5,046	0,373	1,651	14
16	0,033	0,007	0,036	4	0,036	0,003	0,017	14	0,030	0,001	0,040	24	0,080	0,017	0,019	5
17	1,745	0,119	1,601	15	1,699	0,018	0,673	96	1,572	0,020	1,522	78	4,383	0,296	1,566	15
18	0,039	0,005	0,027	8	0,027	0,001	0,015	51	0,030	0,000	0,033	95	0,082	0,010	0,027	8
19	0,870	0,014	0,000	62	0,843	0,001		1640	0,439		0,000		2,193	0,019		116
20	0,429	0,004	0,378	122	0,451	0,001	0,115	881	0,288		0,352		1,229	0,011	0,342	108
21	0,664	0,018	0,001	38	0,703	0,001		561	0,453	0,000	0,000		1,801	0,034		52
22	0,001		0,000		0,000				0,000	0,000		6	0,001	0,000		11
23	1,650	0,031	1,468	53	1,374	0,003	0,476	448	1,099	0,010	1,263	108	3,783	0,086	1,280	44
24	0,628	0,007	0,508	89	0,433	0,001	0,144	706	0,366		0,375		1,551	0,017	0,444	89
25	0,053	0,006		9	0,051	0,001		69	0,037	0,000	0,000	460	0,122	0,013		10
26	0,016	0,000	0,014	34	0,018		0,006		0,014	0,000	0,014	103	0,040	0,002	0,011	18
27	0,027	0,007	0,025	4	0,025	0,002	0,011	12	0,023	0,001	0,024	30	0,056	0,016	0,022	3
28	0,017	0,001	0,012	14	0,012		0,005		0,011	0,000	0,013	32	0,031	0,003	0,012	10
29	0,741	0,024	0,631	31	0,504	0,002	0,195	206	0,474		0,515		1,493	0,054	0,522	28
30	0,008	0,002	0,007	5	0,005		0,004		0,008	0,000	0,006	38	0,017	0,003	0,007	7
31	0,541	0,003	0,469	173	0,376		0,151		0,331		0,352		1,253	0,009	0,365	140
32	0,006	0,001	0,006	5	0,006	0,000	0,002	18	0,005		0,005		0,015	0,002	0,006	9
33	0,048	0,012	0,055	4	0,046	0,003	0,025	17	0,047	0,002	0,037	27	0,115	0,032	0,047	4
34	0,044	0,004	0,045	11	0,035	0,003	0,009	14	0,024	0,003	0,028	8	0,111	0,012	0,027	9
35	0,008	0,000	0,006	18	0,005		0,003		0,006	0,000	0,008	64	0,016	0,001	0,008	11
36	0,134	0,031	0,111	4	0,084	0,007	0,094	11	0,129	0,007	0,120	18	0,310	0,086	0,146	4
37	0,005	0,001	0,006	4	0,004	0,001	0,004	7	0,005	0,000	0,004	22	0,013	0,003	0,005	4
38	0,525	0,015	0,463	36	0,345	0,001	0,149	299	0,343		0,401		1,159	0,025	0,395	46
39	0,011	0,001	0,007	10	0,008	0,001	0,003	14	0,008	0,001	0,011	15	0,025	0,003	0,010	8
40	0,018	0,002	0,018	8	0,010	0,001	0,007	20	0,012	0,000	0,013	27	0,031	0,007	0,012	5
41	1,425	0,107	1,193	13	1,049	0,021	0,594	50	1,038	0,033	1,191	32	2,712	0,233	1,187	12
42	0,278	0,093	0,192	3	0,234	0,026	0,192	9	0,290	0,026	0,310	11	0,655	0,174	0,320	4
43	0,098	0,024		4	0,092	0,006		16	0,084	0,003		24	0,099	0,020		5

Capítulo 3. Cuantificación de ADN

44	0,007	0,001	0,008	8	0,007	0,000	0,003	27	0,008	0,000	0,007	30	0,009	0,001	0,005	12
45	0,021	0,003	0,016	6	0,021	0,001	0,009	25	0,022	0,000	0,018	52	0,023	0,003	0,010	9
46	0,054	0,012	0,052	4	0,052	0,005	0,024	11	0,045	0,003	0,046	16	0,056	0,013	0,044	4
47	0,042	0,007	0,054	6	0,050	0,002	0,021	30	0,048	0,001	0,048	51	0,053	0,005	0,029	11
48	0,038	0,003	0,037	12	0,034	0,000	0,018	83	0,037		0,046		0,039	0,002	0,025	17
49	0,024	0,004	0,014	6	0,019	0,001	0,010	18	0,017	0,001	0,016	17	0,045	0,008	0,025	6
50	0,544	0,002	0,310	237	0,454		0,121		0,274	0,001	0,515	274	1,228	0,009	0,343	135
51	0,048	0,006	0,042	8	0,031	0,001	0,018	28	0,033	0,002	0,031	18	0,095	0,013	0,082	7
52	0,289	0,004	0,229	78	0,170	0,003	0,067	59	0,126	0,003	0,186	37	0,629	0,015	0,318	42
53	0,616	0,012	0,000	53	0,537	0,000		1411	0,359		0,000		1,478	0,013	0,001	111
54	0,119	0,001	0,092	188	0,114		0,028		0,085		0,106		0,378	0,003	0,075	121
55	0,385	0,003		127	0,387				0,258		0,000		1,148	0,005		244
56	0,203	0,001	0,203	197	0,259	0,000	0,075	943	0,217		0,279		0,648	0,010	0,244	67
57	0,455	0,002	0,400	187	0,477	0,001	0,128	831	0,321		0,406		1,141	0,014	0,367	84
58	0,460	0,006	0,418	75	0,396	0,002	0,147	253	0,332		0,498		1,118	0,029	0,393	38
59	0,277	0,002	0,283	111	0,199		0,093		0,190		0,228		0,587	0,011	0,213	55
60	0,646	0,006	0,616	108	0,531	0,002	0,205	323	0,427	0,003	0,499	142	1,727	0,026	0,493	67
61	1,054	0,032	0,970	33	1,142	0,003	0,344	363	0,799	0,006	0,957	144	2,376	0,083	0,919	28
62	0,371	0,005	0,364	79	0,315	0,001	0,096	512	0,246	0,002	0,246	104	0,945	0,018	0,328	52

Capítulo 4. Amplificación de ADN



El mundo está lleno de obviedades en las que nadie se fija ni por casualidad.

Sherlock Holmes, El sabueso de los Baskerville.



Resumen: El presente capítulo tiene el objetivo de hacer una revisión de las principales estrategias de amplificación en restos humanos críticos, tanto de STRs autosómicos como de STRs de cromosomas sexuales, y otros marcadores como los InDels o los INNULs. A continuación, se realizan tres experimentos. En primer lugar, se comparan los principales kits comerciales de STRs de 6 colores disponibles actualmente: Globalfiler™, PowerPlex® Fusion 6C, e Investigator® 24Plex QS, no encontrando diferencias significativas entre ellos. En segundo lugar, se comparan kits comerciales de amplificación de Y-STRs: Yfiler™ Plus, PowerPlex® Y23 e Investigator® Argus Y-28, mostrándose el kit de Promega como el más eficiente en términos de marcadores reportables. Finalmente, se explora la aplicación del kit de INNULs InnoTyper® 21, que si bien obtiene más marcadores comparándolo con el kit de STRs autosómicos Globalfiler®, se muestran similares en cuanto a poder de discriminación para la misma muestra.

Palabras clave: Inhibición; INNULs; Kits comerciales; STRs autosómicos; Y-STRs

Abstract: This chapter aims to review the main amplification strategies for critical human remains, including both autosomal STRs and sexual chromosome STRs, as well as other markers such as InDels or INNULs. Three experiments are then conducted. Firstly, the main commercially available 6-color STR kits are compared: Globalfiler™, PowerPlex® Fusion 6C, and Investigator® 24Plex QS, with no significant differences found between them. Secondly, commercial Y-STR amplification kits are compared: Yfiler™ Plus, PowerPlex® Y23, and Investigator® Argus Y-28, with the Promega kit proving to be the most efficient in terms of reportable markers. Finally, the application of the INNULs kit InnoTyper® 21 is explored. Although it obtains more markers compared to the autosomal STR kit Globalfiler®, both kits exhibit similar discriminatory power for the same sample.

Keywords: Autosomal STRs; Commercial kits; Inhibition; INNULs; Y-STRs

1. Introducción

Una vez hemos obtenido ADN de la muestra y comprobado que se encuentra en cantidad y calidad suficiente, el siguiente paso es visualizarlo. No va a ser la totalidad del material genético la que se estudie, será un pequeño porcentaje de unas regiones a las que se denominan marcadores. Las muestras forenses en general y los restos óseos en particular contienen poco ADN que, además, suele estar degradado, lo que supone un problema para el análisis de ADN.

Este problema vio la luz en los años ochenta con Kary Mullis. Hasta entonces se utilizaba el método de endonucleasas de restricción para aislar fragmentos de ADN para después clonarlo, una técnica que presentaba sus limitaciones como la incapacidad de copiar una secuencia que no se conociera de antemano. Mullis proponía una reacción en cadena de la polimerasa en la que el ADN molde se sometía a una alta temperatura para que se desnaturalizara, a continuación, se disminuía la temperatura para que hibridasen unos cebadores complementarios, de manera que en la siguiente fase se replicaran las cadenas de ADN molde de manera similar a como ocurre en las células (**Figura 1**). Repitiendo esta operación en 20-27 ciclos se podían obtener millones de copias de los fragmentos de ADN de interés [1].

Desde entonces la PCR ha evolucionado mucho, adaptándose a las necesidades de cada aplicación. Para los laboratorios forenses se han ido desarrollando kits comerciales en los que simplemente hay que introducir el extracto de ADN en una cantidad concreta, kits que normalmente contienen Tris-HCl a pH 8,3, MgCl₂ (cofactor), KCl (facilitador de la extensión), dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato), ADN polimerasa, BSA (albúmina bovina sérica, estabilizador de enzimas), y cebadores (*primers*) [2].

Una de las claves para una PCR exitosa es un buen diseño de primers, que generalmente deben tener temperaturas de *melting* (T_m, temperatura en la que la mitad de la cadena está desnaturalizada) similares, un contenido G/C (de guanina y citosina) balanceado, evitando la auto complementariedad y que adopten una estructura a modo de horquilla, para lo que existen hoy en día diversas herramientas de bioinformática [3].

Finalmente, la PCR no sería posible sin un dispositivo que permita subir y bajar la temperatura de la reacción rápidamente, para lo cual surge el termociclador en 1985 de la mano de Perkin Elmer y Cetus [4].

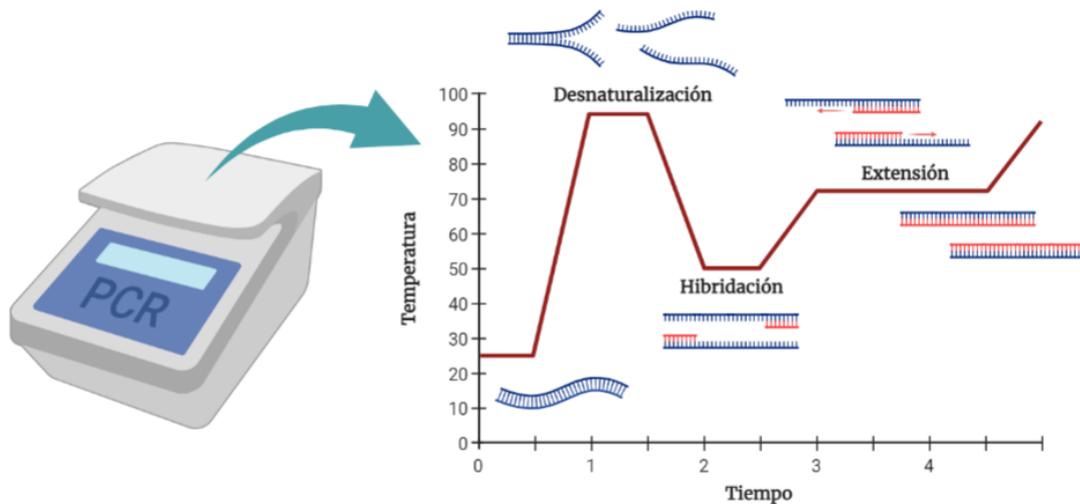


Figura 1. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa. Editado con Biorender

2. STRs autosómicos

Es habitual establecer la distinción entre ADN codificante, aquel que contiene la información para la síntesis de una proteína, y ADN no codificante o *basura*, sin una función clara conocida. El genoma de los organismos eucariotas está lleno de secuencias de ADN de todos los tamaños que se repiten en el mismo, formando regiones que a veces se denominan satélite (precisamente porque se visualizaban como bandas satélite cuando comenzaban a estudiarse). Las unidades de repetición de longitud media, comúnmente llamadas minisatélite o VNTR (*variant number of tandem repeats*, repeticiones en tándem en número variable), van de las 10 a las 100 unidades. Cuando las unidades de repetición son más cortas, de 2-6 pares de bases, se denominan STRs, *short tandem repeats* o repeticiones cortas en tándem (véase la **Figura 2**). El número de repeticiones hallados en los marcadores STRs varían enormemente entre individuos, lo que los hace idóneos para identificación humana [5].

No se ha establecido cuáles es el mecanismo por el que se produce la mutación de los STRs, pero se han propuesto tres: cruces desiguales en la meiosis (mecanismo que se conoce por generar grandes bloques de ADN satélite), mecanismos de retrotransposición (asociados a STRs con un alto contenido en adenina), y tartamudeo de la polimerasa durante la replicación, del mismo modo en que se forman los *stutters*. En cualquier caso estas mutaciones van a venir determinadas por el número de repeticiones y el número de unidades, estructura, y composición de las mismas, así como de las regiones flanqueantes, la recombinación, el sexo (las mutaciones son mayores en las células germinales son mayores en mujeres), la edad (a mayor edad mayor número de mutaciones en las células germinales, o inserciones y deleciones que modifiquen su alterabilidad [6]).

Los STRs fueron descritos a principios de los años 90, y desde entonces el *Forensic Science Service* del Reino Unido buscó diligentemente nuevos loci y realizó estudios poblacionales de los STR candidatos, a lo que contribuyeron laboratorios de Canadá y del resto de Europa. En esa década se desarrollaron también los primeros kits comerciales, y poco después el FBI empezó a estructurar lo que posteriormente sería la base de datos CODIS [7].

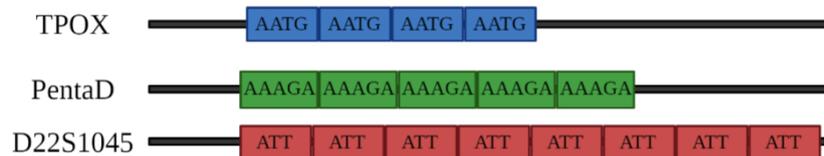


Figura 2. Short tandem repeats (STRs). Editado con Biorender

Son varias las ventajas que justifican el uso forense de los STRs [8]: abundancia de STRs que se conocen, tamaño pequeño (idóneo para muestras degradadas), se pueden amplificar varios a la vez, frecuencia a lo largo del genoma, necesitan poca cantidad de ADN molde, los alelos son similares en tamaño, y son altamente variables. A la hora de elegir un locus se tienen en cuenta diversos factores [9]: poder de discriminación mayor a 0,9 (heterocigosidad observada >70%), tamaño de los alelos de entre 90-500 pb (alelos más grandes pierden precisión, y cuanto más pequeños menor posibilidad de *drop-out*), localización en el cromosoma (loci no vinculados), y robustez y fiabilidad en los resultados, así como aparición de pocos *stutters*.

Los STRs se heredan siguiendo las leyes de Mendel, de manera que los alelos de un mismo marcador formarán de manera independiente las células germinales. Por ejemplo, un individuo cuyos progenitores son 5/6 y 6/7 podrá ser 5/6, 6/6, ó 6/7 para ese marcador (**Figura 3**).

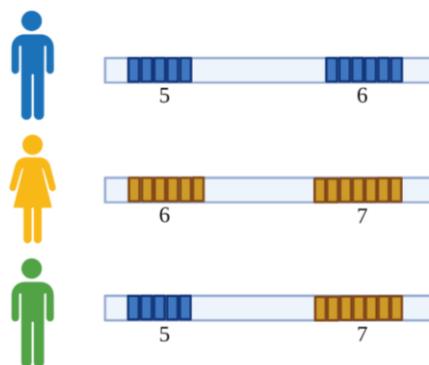


Figura 3. Esquema de la herencia de los STRs. Editado con Biorender

Generalmente los STRs se denominan con un formato alfanumérico: por ejemplo, el marcador D21S11 se construye con la D de DNA, 21 por localizarse en el cromosoma 21, S por ser una repetición corta en tándem (*STR*), y 11 por ser la onceava descrita para el cromosoma 21 [8]. Otros deben su nombre al locus en el que se encuentran, como es el caso de CSF1PO (receptor

CSF-1 del cromosoma 5), FGA (localizado en el locus del fibrinógeno), TH01 (tirosina hidroxilasa), TPOX (peroxidasa tiroidea), o de vWA (gen del factor de von Willebrand) [10]. Mención especial merece el marcador amelogenina, que amplifica un intrón de dicho gen, que tiene sus homólogos en el cromosoma X e Y si lo hubiere, permitiendo por tanto determinar el sexo [11].

Con respecto a su estructura, los STRs pueden ser repeticiones de una única secuencia (TPOX), repeticiones simples con alelos no-consenso (como es el caso de TH01), repeticiones complejas con alelos no consenso (véase vWA), y repeticiones complejas (por ejemplo, D21S11) [12].

La *nomenclatura* que siguen los STRs es precisamente la del número de repeticiones que presentan los alelos. Por ejemplo, si el marcador D8S1179 tiene dos alelos, 10 y 12, será precisamente 10-12 como se designe. Hay casos especiales como en el marcador TH01, en el que los elementos de repetición pueden estar incompletos, siendo, por ejemplo, un alelo 9 ([AATG]₉) y el otro 9.3, en el que se encuentran 9 elementos de repetición más uno incompleto de tres nucleótidos ([AATG]₉AAT) [13].

Dado que los STRs obtenidos deben ser evaluados estadísticamente, las bases de datos de estos marcadores se vuelven una herramienta fundamental. Hay varias disponibles, entre las que destacan STRBase (Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase) [14] y STRidER (STRs for Identity ENFSI Reference Database) [15].

Finalmente, queda la cuestión de qué marcadores son los que se analizan, pues resulta lógico pensar en la importancia de que los diferentes laboratorios de los distintos países analicen los mismos con el fin de que la información sea comparable. A este respecto el *Federal Bureau Investigation* estableció 13 marcadores para su base de datos genética, mejor conocida como CODIS (*Combined DNA Index System*): CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S359, D18S51, y D21S11, escogidos teniendo en cuenta su poder de discriminación, su aplicabilidad para mezclas y muestras de gradadas, y otras cuestiones de índole práctica o económica [16]. Esta base de datos fue creciendo, llegando un momento en que el grupo de trabajo de CODIS planteó la necesidad de aumentar el número de marcadores con el fin de disminuir la probabilidad de hacer identificaciones adventicias, de mejorar la compatibilidad entre los resultados proporcionados por las distintas organizaciones policiales, y para aumentar el poder de discriminación [17]. Finalmente, CODIS se aumentó de 13 a 20 marcadores, añadiéndose los marcadores D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 y D22S1045 a los ya existentes, aprovechando que se utilizaban en los kits comerciales disponibles en aquel momento [18].

La Unión Europea, con el objetivo de favorecer la cooperación y el intercambio de información entre los estados miembros, cuenta con su propio núcleo de marcadores (seleccionados por la ENFSI, *European network of forensic science institutes*) conocidos como *European Standard Set* (ESS), en el que inicialmente figuraban los loci D3S1358, vWA, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, y FGA [19], pero que posteriormente fue ampliado incluyendo, además de los anteriores, los loci D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, y D22S1045 [20].

Actualmente se están haciendo esfuerzos por buscar nuevos marcadores que permitan aumentar todavía más ese núcleo de loci, no solamente mejorando el poder de discriminación, sino también permitiendo mejorar la resolución de contextos forenses habituales como es la aparición de mezclas de perfiles [21].

2.1. Kits comerciales de auSTRs

A la hora de amplificar STRs autosómicos hay diversos kits disponibles, diferenciándose no tanto en la cantidad o el tipo de marcadores incluidos como en los primers que utilizan para amplificarlos. En la **Tabla 1** se muestra un resumen de los mismos, y en la **Figura 4** un esquema del tamaño de los amplicones.

Los kits comerciales consisten en una amplificación multiplex de varias parejas de primers en la misma reacción. Estos primers están marcados con un fluorocromo, que será el que se detecte en la fase siguiente, de manera que el uso de diferentes fluorocromos permite la visualización posterior de fragmentos de tamaño similar de marcadores diferentes. El genotipado se hará posteriormente comparando los fragmentos obtenidos con un estándar de tamaño y una escalera alélica [22].

A principios de los años 2000, viéndose popularizado el uso de kits comerciales para amplificar STRs autosómicos, se observó su escasa eficacia cuando la muestra estaba degradada, lo que se traducía en la obtención de perfiles parciales o fenómenos de *drop-out*. Teniendo en cuenta la variabilidad por la que precisamente se buscan, los amplicones de STRs se desarrollan dejando lo que se conocen como regiones flanqueantes, de manera que si se diseñan los primers para estar lo más cerca posible de los loci se puede obtener una reducción de 50-300 pares de bases en los amplicones, mejorando bastante el análisis de muestras degradadas con estos nuevos miniSTRs [23]. Con esta premisa se tomaron los marcadores más grandes del kit Identifiler® de Applied Biosystems (actualmente Thermo Fisher) para desarrollar el kit Minifiler™, que incluía los miniSTRs de los marcadores D7S820, D13S317, D16S539, D21S11, D2S1338, D18S51, CSF1PO, y FGA, con un significativo mejor comportamiento ante muestras degradadas [24]. Actualmente este kit ha sido absorbido por el kit GlobalFiler™.

Los tres kits comerciales han sido validados para muestras de restos óseos [25–27]. Con respecto a la sensibilidad, con GlobalFiler™ se podían obtener perfiles completos con hasta 125 pg de ADN [25], un rendimiento similar al observado en PowerPlex® Fusion 6C System [26] y en Investigator 24plex QS Kit [27]. Otro tanto puede decirse acerca de la especificidad y el comportamiento frente a inhibidores de la PCR.

Cabe señalar que los kits de QIAGEN incluyen un indicador de calidad, un control interno que informa del éxito en la amplificación, la ausencia de ADN en la muestra, o si está inhibido o degradado. Recientemente se ha desarrollado el kit Investigator 26plex QS (QIAGEN), que incluye, además de los citados marcadores, los Penta D y Penta E [28].

Son pocos los estudios que comparan el rendimiento de los kits comerciales con muestras de restos óseos antiguos. A este respecto que la sensibilidad de GlobalFiler™ es mayor que la de Investigator® 24plex QS, mientras que este último presenta una mayor tolerancia frente a inhibidores que el primero, siendo GlobalFiler™ el que mayor altura de picos arroja [29]. Otro estudio llega a conclusiones similares en cuanto a la sensibilidad de GlobalFiler™, mejorada con respecto a su kit predecesor Identifiler® Plus, si bien señala los sensores de calidad incluidos en Investigator 24plex de gran ayuda para determinar la degradación de la muestra [30]. Otro estudio consigue perfiles con 0,0625 ng de ADN utilizando una PCR multiplex con primers para MiniSTRs, consiguiendo un éxito mucho mayor si se combinaba esta técnica con el kit PowerPlex® Fusion 6C [31].

Tabla 1. Kits comerciales de amplificación de auSTRs

Kit	Formato (reacciones)	Loci			Dye	N.º ciclos	Cantidad ADN (ng)
GlobalFiler™ (ThermoFisher) [32]	200 1000	CSF1PO D10S1248 D12S391 D13S317 D16S539 D18S51 D19S433 D1S1656	D21S11 D22S1045 D2S1338 D2S441 D3S1358 D5S818 D7S820 D8S1179	FGA SE33 TH01 TPOX vWA DYS391 Yindel Amelogenina	6- FAM™ VIC™ NED™ TAZ™ SID™ LIZ™	29-30	0,5-1
PowerPlex® Fusion 6C System (Promega) [33]	50 200 800	CSF1PO D10S1248 D12S391 D13S317 D16S539 D18S51 D19S433 D1S1656 D21S11	D22S1045 D2S1338 D2S441 D3S1358 D5S818 D7S820 D8S1179 FGA Penta D	Penta E SE33 TH01 TPOX vWA DYS391 DYS570 DYS576 Amelogenina	FL-6C JOE-6C TMR-6C CXR-6C TOM-6C WEN	29	1,0
Investigator® 24plex QS (QIAGEN) [34]	100 400	CSF1PO D10S1248 D12S391 D13S317 D16S539 D18S51 D19S433 D1S1656	D21S11 D22S1045 D2S1338 D2S441 D3S1358 D5S818 D7S820 D8S1179	FGA SE33 TH01 TPOX vWA DYS391 Amelogenina	6- FAM™ BTG BTY BTR2 BTP BTO	27	0,5

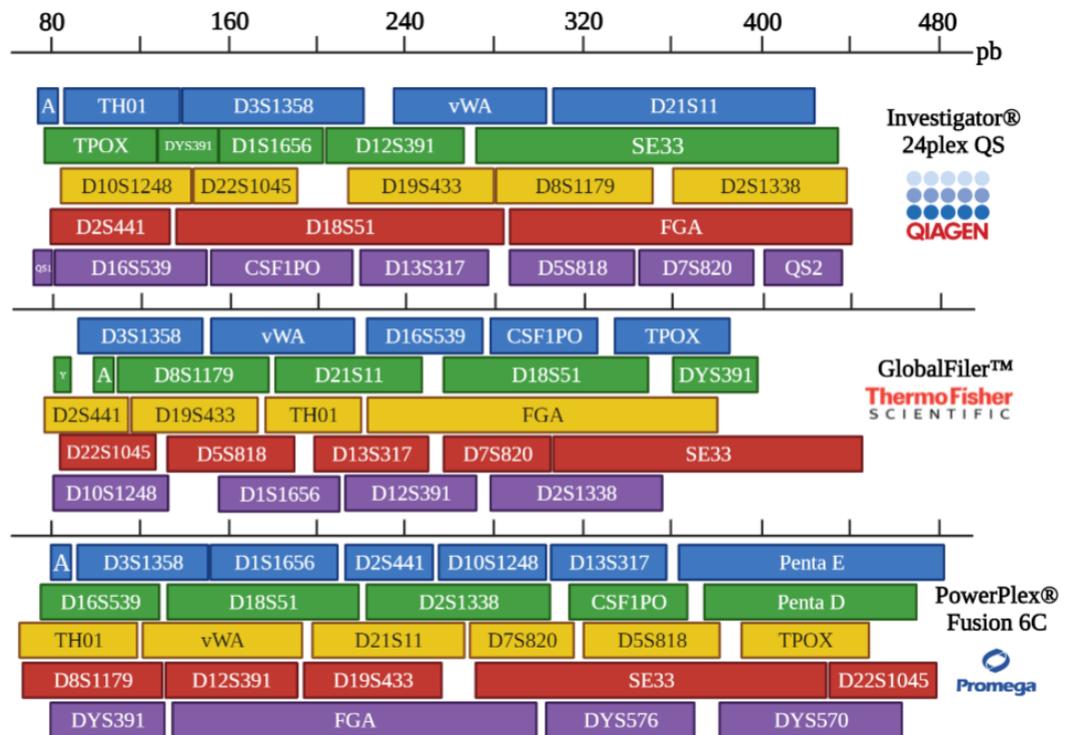


Figura 4. Esquema de los amplicones de los diferentes kits comerciales de auSTRs por tamaño en pares de bases [35]. Editado con Biorender

La más reciente novedad ha venido de manos del kit PowerPlex® 35GY desarrollado por Promega para su nuevo equipo de electroforesis capilar de 8 colores, que incluye 20 marcadores de CODIS (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11 y D22S1045), dos marcadores para determinación del sexo (amelogenina y DYS391), los marcadores Penta D, Penta E y SE33, y 10 Y-STRs (DYS385ab, DYS390, DYS438, DYS448, DYS456, DYS458, DYS481, DYS635 y DYS643); prometedor para el análisis de restos óseos críticos al disponer de 12 marcadores de menos de 200 pb [36].

3. STRs de cromosomas sexuales

Ya hemos visto que los marcadores autosómicos se heredan de forma biparental, ¿pero es este el único mecanismo? Para responder a esta pregunta en los siguientes epígrafes nos dedicaremos a analizar el interés forense del estudio del cromosoma Y, del cromosoma X y del ADN mitocondrial, como se ve en la **Figura 5**, tienen una forma particular de heredarse.

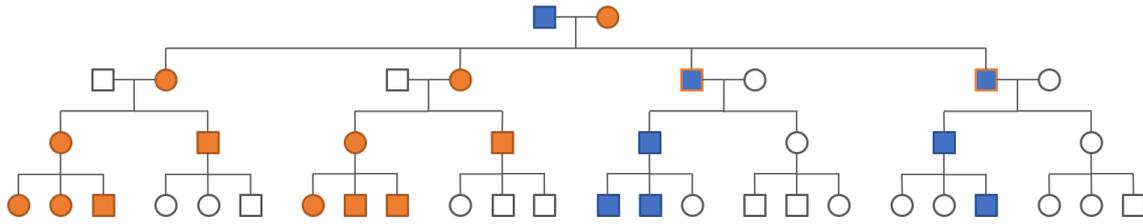


Figura 5. Esquema de la herencia del cromosoma Y (azul) y del ADN mitocondrial (naranja). Editado con Biorender

3.1. STRs del cromosoma Y (Y-STRs)

En el año 1999 una joven holandesa fue víctima de una violación y posterior asesinato en un crimen sin testigos y con trazas de semen en el cuerpo como único indicio, de las que no pudo obtenerse un perfil de STRs autosómicos. Ante ese escenario, aderezado con una cuestión racial, se pidió ayuda al Dr. de Knijff, que tenía a sus espaldas varias publicaciones sobre el estudio genético del cromosoma Y. De Knijff demostró que la muestra procedía del Noroeste de Europa, y un cribado en 2012 obtuvo, finalmente, una coincidencia en el cromosoma Y [37].

El cromosoma Y es uno de los cromosomas más pequeños, formado por aproximadamente 60 millones de nucleótidos. Los extremos del cromosoma Y se denominan regiones pseudoautosómicas, que pueden recombinarse con el cromosoma X; el 95% restante se considera no recombinante, que se transmite en bloque de padres a hijos (salvo eventos de mutación) [38]. La primera vez que se describieron secuencias de repetición en el cromosoma Y fue en 1992, encontrándose repeticiones del tipo $[GATA]_n$ [39]. Rápidamente se vio la utilidad forense de estos marcadores, utilizándose poco después para exonerar a un sospechoso que se hallaba en prisión preventiva analizando 3 Y-STRs de un hisopado vaginal [40].

Son varias las *aplicaciones* del análisis forense del cromosoma Y [41]: identificación mediante linaje paterno, investigación biológica de la paternidad u otra relación por vía paterna, diferenciación de parientes varones, inferencia del origen geográfico y estudios de Antropología Molecular. Su uso forense está tasado y validado por la ISFG [42,43].

La *nomenclatura* de los Y-STRs es prácticamente igual a la de los marcadores autosómicos, con unas cuantas consideraciones [43]. Hay situaciones en las que se amplifica más de un locus específico del cromosoma Y con un único par de primers, como es el caso de DYS385a/b, que como no puede distinguirse entre los dos fragmentos, se recomienda expresarse como DYS385 alelo1-alelo2. Otras veces puede suceder que un único locus se reporte como doble con una mutación en una de las copias, como es el caso de DYS19, DYS385, DYS389, DYS390, DYS391, DYS393, DYS437 y DYS439, expresando el resultado con ambos alelos separados con un guion. Finalmente, puede suceder que dos Y-STRs diferentes se amplifiquen con primers específicos por estar lo suficientemente alejados uno de otro, tal es el caso de DYS448, DYS449,

DYS552 y GATA H4 (que se llamarían, por ejemplo, DYS448.1 y DYS448.2). Se observará que este es el único que recibe un nombre diferente, correspondiente a su motivo de repetición TAGA, y que ha sido denominado de maneras diferentes en la literatura [44].

Estas consideraciones se deben a que algunos marcadores del cromosoma Y tienen secuencias palindrómicas [45], aquellas que se leen igual en sentido 5'-3' que en 3'-5'. Por ejemplo, el marcador DYS385 está presente en dos regiones del brazo largo del cromosoma Y, separadas por unos 40 000 pares de bases, pudiendo producir dos alelos diferentes al ser amplificados. DYS389 es otro caso en el que pueden obtenerse dos productos de PCR a partir de un único par de primers, sin embargo, en este marcador sucede que el primer *forward* se une a dos regiones diferentes separadas por unos 120 pares de bases, produciendo por tanto dos productos de amplificación, uno más grande que otro (véase la **Figura 6**).

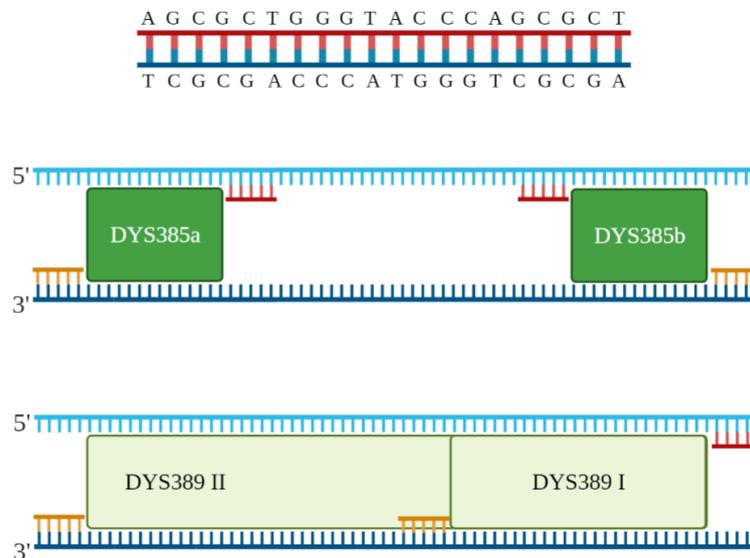


Figura 6. Esquema de una secuencia de ADN palindrómica y de los marcadores DYS385 y DYS389. Editado con Biorender

Mención especial requieren los RM-Y-STRs o Y-STRs de mutación rápida (*rapid mutation*), que son STRs del cromosoma Y cuyo ratio de mutación es extremadamente alto, como son DYF387S1, DYF399S1, DYF403S1, DYF404S1, DYS449, DYS518, DYS526, DYS547, DYS570, DYS576, DYS612, DYS626, y DYS627, debido entre otros factores a tartamudeos de la polimerasa cuando el número de repeticiones es muy alto, marcadores incluidos en los kits actuales y que permiten distinguir entre dos individuos por sus marcadores del cromosoma Y pese a estar emparentados por vía paterna [46].

Finalmente, la base de datos por excelencia para marcadores STR del cromosoma Y es YHRD (*Y Chromosome Haplotype Reference Database*), resultado de unir las bases de datos de Europa, Asia y Estados Unidos, proporcionando un repositorio con todos los haplotipos de cromosoma Y observados en el mundo [47]. Y es que a diferencia de los auSTRs, el cromosoma

Y se hereda en bloque, por lo que los marcadores de este cromosoma no van a ser independientes, formando lo que se denomina *haplotipo*. Ahí reside la importancia de la disponibilidad de bases de datos como YHRD.

3.1.1. Kits comerciales para análisis de Y-STRs

Los kits comerciales de Y-STRs han evolucionado de una forma similar a los kits de auSTRs, incorporándose más loci con los avances en electroforesis capilar, tecnología, resolución y distribución de los fragmentos amplificados en la PCR. Los primeros kits se lanzaron entre 2003 y 2009, amplificando entre 12 y 16 loci: PowerPlex Y12 System, AmpFLSTR Yfiler, e Investigator Argus Y-12 [48]. En los últimos años estos kits han evolucionado para dar más marcadores, como se muestra en la **Tabla 2**. En la **Figura 7** pueden verse los tamaños de los amplicones de cada kit.

Tabla 2. Kits comerciales de Y-STRs

Kit	Formato (reacciones)	Loci		Dye	N.º ciclos	Cantidad ADN (ng)
Yfiler™ Plus (ThermoFisher) [49]	100 500	DYF387S1 DYS19 DYS385a/b DYS389I DYS389II DYS390 DYS391 DYS392 DYS393 DYS437 DYS438 DYS439 DYS448	DYS449 DYS456 DYS458 DYS460 DYS481 DYS518 DYS533 DYS570 DYS576 DYS627 DYS635 YGATAH4	6-FAM™ VIC™ NED™ TAZ™ SID™ LIZ™	30	0,5
PowerPlex® Y23 System (Promega) [50]	50 200	DYS19 DYS385a/b DYS389I DYS389II DYS390 DYS391 DYS392 DYS393 DYS437 DYS438 DYS439	DYS448 DYS456 DYS458 DYS481 DYS533 DYS549 DYS570 DYS576 DYS635 DYS643 Y-GATA-H4	Fluoresceína JOE TMR-ET CXR-ET WEN	30	0,5
Investigator® Argus Y-28 QS (QIAGEN) [51]	100 400	DYS19 DYS385 DYS389-I DYS389-II DYS390 DYS391 DYS392 DYS393 DYS437 DYS438 DYS439 DYS448 DYS449	DYS456 DYS458 DYS460 DYS481 DYS518 DYS533 DYS549 DYS570 DYS576 DYS627 DYS635 DYS643 YGATAH4	6-FAM™ BTG BTY BTR2 BTP BTO	30	0,5

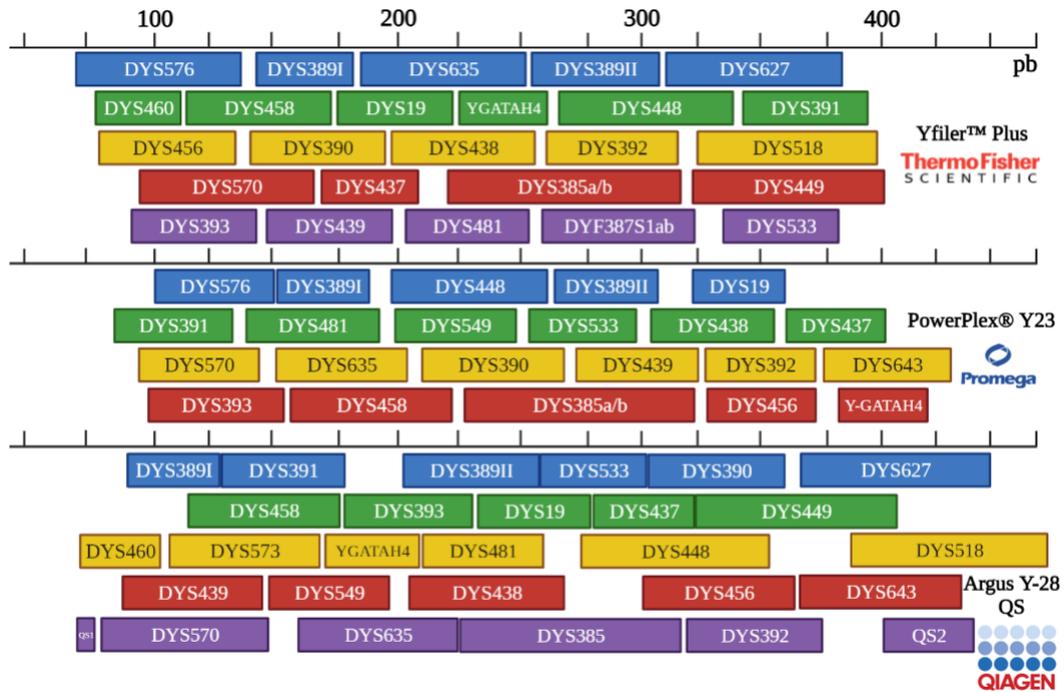


Figura 7. Esquema de los amplicones de los diferentes kits de Y-STRs por tamaño en pares de bases

Una comparativa entre Yfiler™, Yfiler™ Plus y PowerPlex® Y23 mostró la mejora de estos dos últimos con respecto al primero en cuanto a sensibilidad, siendo el kit de Promega más sensible cuanto la cantidad de ADN era inferior a 0,5 ng [52].

3.2. STRs del cromosoma X (X-STRs)

La herencia de los marcadores de tipo STR del cromosoma X o X-STRs (véase la **Figura 8**) tienen unas cuantas particularidades con respecto a los Y-STRs. Por ejemplo, el cromosoma X que puede dar el padre se hereda en bloque, del mismo modo que el cromosoma Y, sin embargo, no sucede así en el caso de la madre, en el que se recombina para dar lugar a las células gaméticas, lo que explica a su vez su menor ratio de mutación [53]. Estas características son también las consideradas para sus aplicaciones forenses, que si bien a principios de los años 2000 abundaba en publicaciones, estas son cada vez menores [54].

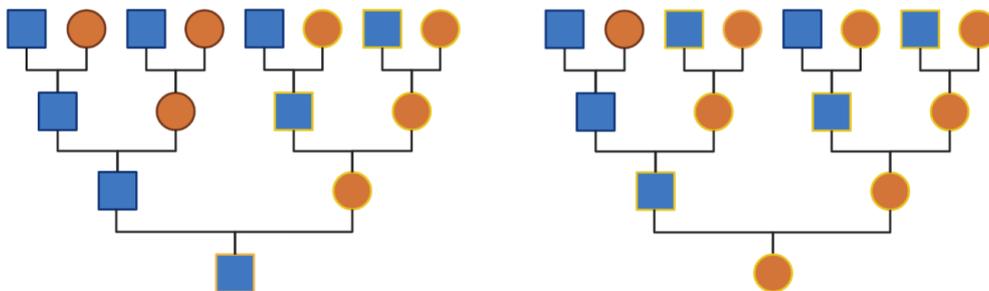


Figura 8. Esquema de la herencia del cromosoma X. Editado con Biorender

Los X-STRs se empezaron a reportar en la década de los 90 con el auge de las investigaciones de este tipo de marcadores, encontrándose en el cromosoma X cada 300-500 pares de bases [55]. En la casuística forense normal su análisis puede resultar superfluo, pero debido a su particular modo de herencia hay situaciones en las que resulta particularmente útil e incluso más informativo que otros marcadores, como en los casos de incesto o en perfiles pobres obtenidos en muestras forenses en los que el cromosoma X puede aportar información [56].

Nuevamente destaca la utilidad de las bases de datos de marcadores de cromosoma X para uso forense con información sobre la estructura de los X-STRs, tasas de mutación y estudios poblacionales, como es el caso de ChrX-STR.org [57].

3.2.1. Kits comerciales para análisis de X-STRs

Son pocos los kits comerciales disponibles para análisis de X-STRs, siendo el más utilizado el Investigator® Argus X-12 de QIAGEN, que amplifica los marcadores DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148 y HPRTB. Este kit es una versión mejorada de su predecesor, en el que se observaron problemas de *drop-out* en poblaciones como la africana, añadiéndose un indicador de calidad y el marcador D21S11 para controlar la posible aparición de mezclas [58]. En la **Tabla 3** y en la *Figura 9* pueden apreciarse sus características.

Tabla 3. Kit comercial para análisis de X-STRs.

Kit	Formato (reacciones)	Loci	Dye	N.º ciclos	Cantidad ADN (ng)
Investigator® Argus X-12 QS [59]	25 100	DXS8378	6- FAM™ BTG BTY BTR BTO	27	0,2-0,5
		DXS7423			
		DXS7132			
		DXS10148			
		DXS10146			
		DXS10135			
		DXS10134			
		DXS10103			
		DXS10101			
		DXS10079			
		DXS10074			
		HPRTB			
		Amelogenina			
		D21S11			

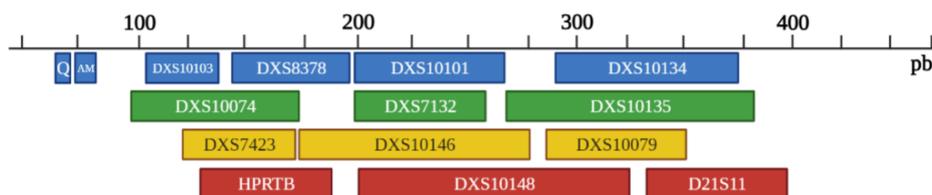


Figura 9. Esquema de los amplicones del kit Investigator® Argus X-12 QS. Editado con Biorender

El análisis de X-STRs en restos óseos antiguos es poco frecuente en la literatura, encontrándose únicamente un estudio que lo utiliza para la determinación del sexo de restos óseos de origen arqueológico de la región de Anatolia (Turquía) [60].

4. Otros marcadores

Más allá de los marcadores de tipo STR y los SNPs (*single nucleotide polymorphism*) que analizaremos en el siguiente capítulo, hay otros marcadores genéticos de menor uso pero que han despertado el interés de la comunidad forense por su pequeño tamaño (véase la *Figura 10*), como son los loci de inserción/delección (indels) y alelos de inserción/nulos (INNULS).

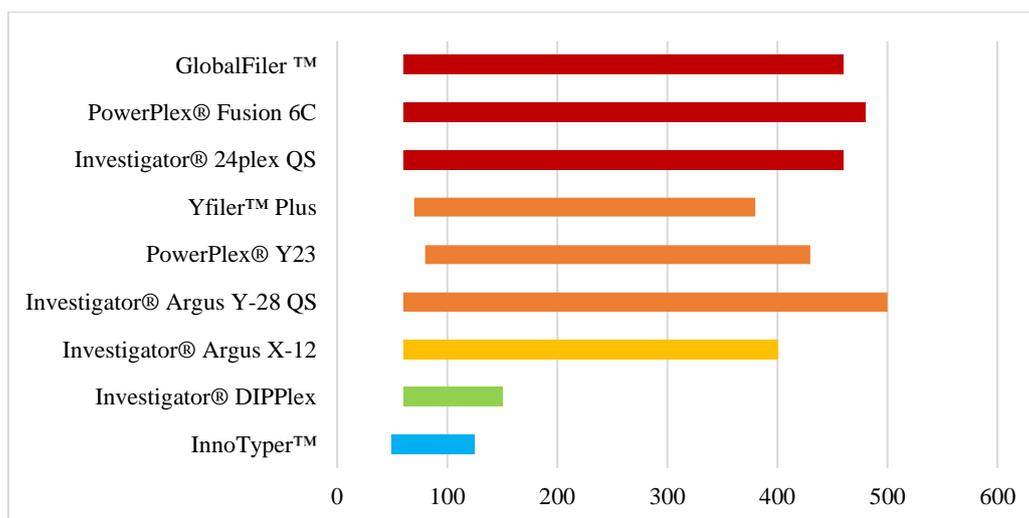


Figura 10. Rango de tamaño de los amplicones (pb) de los diferentes kits comerciales

4.1. InDels

Los polimorfismos de tipo InDel (*insertion and deletion*, también conocidos como DIPs) son una variación de ADN caracterizada por dos estados, inserción (+) o delección (-), en una secuencia de ADN de 1-50 pb. Los InDels (**Figura 11**) despertaron interés hacia finales de la década de los 2000 por el tamaño corto de los amplicones, la baja ratio de mutación, y su alta capacidad para ser multiplexados, y el hecho de que por diferenciarse por tamaño podían ser analizados por electroforesis capilar [61]. Pese a la dificultad de no disponer de suficientes datos poblacionales (y sus posibles variantes que pueden afectar al rendimiento de los primers), presentan un poder de discriminación comparable al de los STRs, de manera que multiplexando en torno a 60 InDels se podría identificar personas desaparecidas [62].

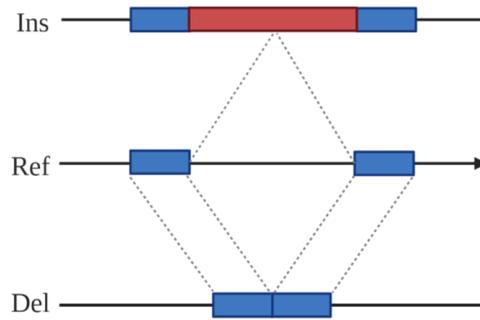


Figura 11. Esquema de un InDel. Editado con Biorender

El kit comercial Investigator® DIPplex de QIAGEN, con formato de 100 reacciones, amplifica 30 InDels dialélicos distribuidos en 19 cromosomas autosómicos: Amelogenina, HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD58, HLD56 (marcados con 6-FAM™), HLD118, HLD92, HLD93, HLD99, HLD88, HLD101, HLD67 (marcados con BTG), HLD83, HLD114, HLD48, HLD124, HLD122, HLD125, HLD64, HLD81 (marcados con BTY), y HLD136, HLD133, HLD97, HLD40, HLD128, HLD39, HLD84 (marcados con BTR), para una cantidad óptima de 0,2-0,5 ng de ADN [63].

Ha sido probado con éxito en la mayoría de los marcadores en muestras de restos óseos del periodo Jōmon [64] y del siglo XIV-XV [65], aunque no hay estudios que lo validen para ADN antiguo con un número aceptable de muestras.

4.2. INNULs

Se conoce como retrotransposones a aquellos componentes genéticos capaces de copiarse y pegarse en diferentes localizaciones del genoma, como son los elementos SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements* o elementos nucleares cortos dispersos) y los LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements* o elementos nucleares largos dispersos). Los polimorfismos de inserción-nulos (INNULs) son marcadores dialélicos derivados de la inserción/deleción de elementos SINE o LINE, siendo polimorfismos estables generados por un único evento de mutación y distribuidos a lo largo del genoma, de forma que su estabilidad, su baja ratio de mutación, y su análisis mediante electroforesis capilar, ventajas que han atraído la atención para su uso forense, para determinación de relaciones biológicas de parentesco, e incluso como marcadores de ancestría [66].

El kit comercial InnoTyper® 21 (InnoGenomics), en formato de 50 ó 100 reacciones, amplifica 20 marcadores INNUL más la amelogenina, amplificando con una cantidad óptima de 0,2-0,5 ng de ADN los marcadores AC4027, MLS26, ALU79712, NBC216 y NBC106 (marcados con FAM™), RG148, NBC13, AC2265 y MLS09 (marcados con JOE), AC1141, TARBP, Amelogenina, AC2305, HS4.69 y NBC51 (marcados con TMR), y ACA1766, NBC120, NBC10,

NBC102, SB19.12, y NBC148 (marcados con ROX), utilizando RGI-ORANGE como estándar de tamaño [67].

Este kit de marcadores INNULs ha sido probado en muestras de ADN de restos óseos antiguos, dando 12 de 16 de ellas resultados de más de 100 RFU en 5 ó más loci, lo que haría de este tipo de marcadores útiles como análisis complementarios a los STRs [68].

5. Problemática de la amplificación y posibles soluciones

Son varios los parámetros de la PCR que pueden modificarse para obtener un mejor rendimiento en el flujo de trabajo en el que se esté implementando: buffers, primers, la ADN polimerasa, el número de ciclos, son algunos de ellos. Y es que la amplificación no está exenta de posibles problemas, como la presencia de inhibidores, la cantidad de ADN molde, o las contaminaciones.

5.1. Inhibición

La extracción de ADN se constituye como la etapa más crítica del análisis de ADN, teniendo en cuenta que se busca el máximo rendimiento al ser habitual contar con muestras antiguas o degradadas. Es por ello que en la extracción pueden copurificarse sustancias que entorpezcan o inhiban la posterior amplificación de ADN, sustancias denominadas inhibidores.

Los inhibidores de la PCR son sustancias que obstaculizan o inhiben la amplificación de ADN por interacciones con el ADN molde o con las ADN polimerasas [69], siendo la causa más común de una PCR fallida (si el ADN molde está en cantidad y calidad suficientes) [70]. En la **Tabla 4** pueden verse algunos de los inhibidores que podrían afectar al trabajo con restos óseos críticos.

Tabla 4. Principales sustancias inhibidores y sus fuentes que pueden afectar al análisis de ADN

Fuente	Sustancia inhibidora	Referencia
Hueso	Colágeno Tipo I	[71]
	Iones de Ca ²⁺	[72]
	Sulfato de condroitina	[70]
Pelo	Melanina	[73]
Ropa	Colorante índigo	[74]
Suelo	Compuestos húmicos	[75]
	Metales pesados	[76]
	Iones de Fe, Cu, Cd, Pb (fosas comunes)	[77]
Extracción ADN	ADN molde dañado	[78]
	Reactivos	[79]

Son varios los mecanismos por los que un inhibidor puede afectar al análisis de ADN, no únicamente en la amplificación [80]: adsorción del ADN a las paredes de los tubos, reacción con los ácidos nucleicos liberados durante la extracción, degradación o modificación del ADN molde, obstaculizando la hibridación de los primers con la cadena de ADN molde, degradación,

desactivación o modificación de la ADN polimerasa, o inhibiendo la unión de sondas o fluorocromos.

Hay diferentes métodos para eliminar o disminuir la presencia de inhibidores de PCR, diferentes en cuanto a su laboriosidad, precio, y tiempo requerido, si bien todos ellos van a tener en común que en mayor o menor medida van a afectar a la amplificación de ADN en términos de especificidad y sensibilidad. Estos métodos de eliminación de inhibidores pueden ser clasificados en cuatro categorías: *bioquímicos* (los más utilizados, basados en la adsorción del ADN a otras sustancias), *inmunológicos* (los que utilizan partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos), *físicos* (sistemas de dos fases acuosas, centrifugación, filtración o dilución), y *fisiológicos* (basados en el crecimiento bacteriano y la biosíntesis de componentes celulares) [81].

Otra forma de lidiar con los inhibidores de la PCR es su eliminación mediante el empleo de diferentes sustancias. La albúmina sérica bovina (BSA) tiene un efecto favorable a la hora de eliminar estas sustancias, si bien su presencia reduce la sensibilidad de la reacción de amplificación [82]. Otro método desnaturaliza y lava las muestras con hidróxido de sodio (NaOH), que tiene la desventaja de degradar el ADN si se hace un uso extensivo del mismo [83]. Otra técnica, sencilla y barata de implementar, es la dilución de los extractos con la finalidad de diluir los inhibidores presentes en los mismos [84].

Como ya se ha indicado en el capítulo sobre extracción de ADN, hay diversos kits comerciales de purificación disponibles, destacando en uso en ADN antiguo los kits de purificación de QIAGEN MinElute PCR Purification Kit y QIAquick PCR Purification Kit, ambos basados en columnas de sílice y sales de tiocianato de guanidinio [85]. MinElute permite purificar hasta 5 μg de ADN de 70 a 4000 pb en un volumen de 10 μl [86], mientras que QIAquick purifica hasta 10 μg de ADN de entre 100 y 10 000 pb en mínimo 30 μl de volumen de elución [87]. Si bien la casa comercial asegura que la pérdida de ADN en el proceso de purificación no supera el 20%, algún ejemplo en la literatura encuentra una pérdida media de en torno al 40% [88]. Ambos se utilizan indistintamente en la literatura, aunque parece ser que una versión anterior al MinElute tenía un mejor rendimiento que QIAquick [89].

A nivel comparativo, un estudio realizado con PowerClean® DNA Clean-Up kit, DNA IQ™ System, el protocolo de fenol-cloroformo, y Chelex®-100, a la hora de eliminar inhibidores de la PCR comunes (melanina, ácido húmico, colágeno, sales biliares, hematina, cloruro de calcio, colorante índigo y urea) vio que los dos primeros tenían un mejor desempeño, siendo la extracción con la resina Chelex® la que más actividad de inhibidores presentaba [90].

Otro enfoque orientado a mejorar el rendimiento de la amplificación en muestras degradadas y/o con inhibición ha sido utilizar polimerasas diferentes. En este sentido se fue observando que había diferencia de rendimiento entre las diferentes polimerasas comerciales

disponibles, sobre todo en función del estado de degradación de la muestra (a lo cual la *Taq* de Invitrogen rendía mejor) [91]. Un estudio posterior mostró que la polimerasa KAPA2G Robust (actualmente de Roche) presentaba una mayor resistencia a inhibidores, mientras que 3GPlant rendía mejor en muestras degradadas, ambas con un mejor rendimiento que AmpliTaq Gold [92]. Un estudio más reciente apunta a las polimerasas KAPA HiFi HotStart (Roche) y PrimeSTAR® HS (Takara Bio) como las mejores en un estudio con cabellos realizado con en total 12 polimerasas diferentes, incluidas la validada AmpliTaq Gold de Applied Biosystems, sin duda la más utilizada por los laboratorios forenses [93].

Estas diferencias se deben a las diferencias moleculares de las diferentes ADN polimerasas, y es que diversos estudios han visto que la polimerasa extraída de *Thermus aquaticus* es más susceptible a los inhibidores que otras como las extraídas de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), *Pyrococcus woesei* (*Pwu*), *Thermus flavus* (*Tfl*) o *Thermus thermophilus* (*Tth*, *rTth*) [94].

5.2. Efectos estocásticos

Estocástico, según el diccionario de la Real Academia Española, del griego *stochastikós*, significa “conjetural”. Cuando se analizan muestras forenses no es infrecuente encontrarnos con que las mismas presentan un número bajo de copias de ADN tras la extracción, lo que en la literatura se denomina LCN-DNA (*Low Copy Number DNA*, ADN de bajo número de copias). En una amplificación en condiciones normales hay tres escenarios posibles con las mismas probabilidades: que la cadena molde no se amplifique, que se amplifique normalmente, o que se produzca un tartamudeo de la polimerasa que desemboque en un *stutter*, siguiendo una distribución de Poisson [95] (una distribución que siguen sucesos con mucha población y baja probabilidad de ocurrencia). Conforme va avanzando la amplificación, puede suceder que se amplifique un alelo preferentemente sobre otro, dando lugar a un desbalanceo alélico en los marcadores heterocigotos; es más, podría amplificar únicamente uno de los dos alelos en cantidad suficiente para ser observado, dando lugar al fenómeno de *drop-out* [96].

Es por ello que para un laboratorio de Genética Forense resulta fundamental la determinación del *umbral estocástico* en sus protocolos, un límite determinado experimentalmente en los propios equipos del laboratorio que alerta al analista de que puede estar ante fenómenos de *drop-out*, y que no es más que un valor de fluorescencia (RFU) condicionado a un sistema concreto de cuantificación y de amplificación, así como del instrumento de detección, conseguido mediante el análisis de diluciones seriadas de ADN [97].

Teniendo en cuenta que la amplificación diferencial de un alelo es un problema grave, ya que puede dar lugar a resultados incorrectos o ambiguos, se ha propuesto como solución aumentar el número de ciclos de PCR [98]. Se ha estudiado hasta qué punto es efectiva esta estrategia, observándose que frente a un protocolo de 28 ciclos, los mismos podían aumentarse hasta 34,

umbral más allá del cual no se obtenía mejora alguna en los perfiles (presumiblemente por el consumo de los reactivos), si bien aumentaba también el número de artefactos conforme se aumentaban los ciclos; es por ello que se recomiendan una serie de medidas cuando se utilice esta técnica, como el trabajo en un laboratorio específicamente diseñado para muestras mínimas, el uso de controles negativos de PCR y de extracción, y la realización de al menos dos análisis desde la extracción para obtener un perfil consenso [99]. A este respecto, un estudio realizado en restos óseos amplificados con GlobalFiler™ propone la estrategia que se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Número de ciclos recomendados según la cantidad de ADN de la muestra para el kit GlobalFiler™ [100]

Cantidad de ADN	Hasta 1,0 ng	1000-500 pg	500-120 pg	< 120 pg
Ciclos recomendados	29	30	31	32

5.3. Contaminación

La PCR es una técnica cuya sensibilidad ha aumentado desde su desarrollo, como se desprende en la cantidad cada vez más baja de *input* de ADN que utilizan los kits comerciales. Esto supone una ventaja enorme para los casos de Criminalística, pero al mismo tiempo es un arma de doble filo porque pueden amplificarse de forma indeseada los marcadores de las personas que recogieron la muestra o que la están analizando, produciéndose entonces una contaminación.

El Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) tiene elaborada una guía de prevención y detección de la contaminación, atajando la misma desde tres frentes [101]:

- 1) *Laboratorio.* Áreas pre y post PCR separadas, presión positiva en la zona de pre PCR y negativa en la de post PCR, instrumental y reactivos exclusivos para su uso en cada área, reducir la manipulación de las muestras y extractos a lo mínimo posible, automatizar procesos con robots, descontaminación regular del instrumental y las superficies del laboratorio.
- 2) *Personal.* El personal del laboratorio debe ir equipado con equipos de protección individual (EPIS) tales como bata de laboratorio, guantes, mascarillas, con el pelo recogido, y debe estar convenientemente entrenado en la prevención y en la detección de cualquier posible contaminación. Asimismo, deberá contrastarse cualquier perfil genético obtenido en las muestras con el del propio personal para detectar o excluir posibles contaminaciones.
- 3) *Consumibles y reactivos.* Cuando sea posible los reactivos deben cumplir con la norma ISO 18385 (requerimientos para minimizar la contaminación de productos para muestras biológicas), y dependiendo de si los reactivos y los materiales lo permiten, se pueden autoclavar o irradiar con luz ultravioleta.

La SWGDAM insiste también en la importancia de los controles negativos (si se detecta cualquier pico o secuencia puede indicar una contaminación), los controles positivos (si se detecta cualquier pico o secuencia más allá de los conocidos para el control positivo, puede sugerir una contaminación), así como de los controles negativos de extracción, también denominados blancos (en los que de detectarse un pico o secuencia sugerirían una posible contaminación en los reactivos y materiales o en el propio desenvolvimiento del protocolo).

6. Experimento #4. Comparativa de kits comerciales de STRs autosómicos en restos óseos críticos

El objetivo de este experimento es comparar la eficiencia de los kits comerciales de STRs autosómicos de 6 colores actualmente disponibles (GlobalFiler™, PowerPlex® Fusion 6C, e Investigator® 24Plex) en 62 muestras de restos humanos críticos. Este ensayo cuenta con una publicación en la revista *Forensic Science International*:

Haarkötter, C., Saiz, M., Gálvez, X., Vinueza-Espinosa, D. C., Medina-Lozano, M. I., Lorente, J. A., & Álvarez, J. C. (2023). Performance comparison of four qPCR and three autosomal STR commercial kits from degraded skeletal remains. En *Forensic Science International* (Vol. 353, p. 111856). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111856>

6.1. Material y métodos

Todos los pasos para la descontaminación de las muestras, extracción, cuantificación y amplificación de los extractos se realizaron en un laboratorio de muestras mínimas, siguiendo las recomendaciones internacionales de trabajo con ADN antiguo [102–104], incluyendo medidas como la limpieza de superficies con DNAZap™ (Invitrogen), presión positiva con sistema de impulsión de aire con filtro HEPA, luz UV para descontaminación de la sala, e indicadores de presencia de ADN endógeno como los índices de degradación, perfiles en “pendiente de esquí”, y cotejo con el personal del laboratorio.

Preparación de las muestras

Se analizó un total de 62 muestras de restos humanos (véase la **Tabla 6**) de fosas comunes de la Guerra Civil y la Posguerra en Andalucía, región cuyo suelo se caracteriza por un pH ácido [105] y temperaturas muy altas en verano [106].

Tabla 6. Muestras de restos humanos analizadas

Muestra	Diente	Tibia	Fémur	Petroso	Total
N	5	10	12	35	62

La superficie de las muestras fue lijada con una herramienta Dremel® [107], cortándose los huesos en fragmentos de 0,5-1 cm. Fragmentos y dientes se sometieron a luz UV en una cabina de 6W, 10 min a cada lado [108], pulverizándose a continuación con un TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Alemania) en dos ciclos de 30 Hz durante 30 segundos.

Extracción de ADN

Las muestras se sometieron a extracción con un protocolo interno basado en el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [109]. A 1,0 gramos de pulverizado se le añadieron 5 ml de tampón de extracción (compuesto por 4125 µl de EDTA 0,5M, 300 µl de SDS al 10%, 375 µl de proteinasa K a 10 mg/ml, y 200 µl de DTT 1M. Las muestras se lisaron durante toda la noche a 56 °C, añadiéndose posteriormente al lisado 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:21:1. El sobrenadante se concentró

Capítulo 4. Amplificación de ADN

con columnas Amicon Ultra-4 de 30 kDa (Merck, KGaA) y los extractos se purificaron con el kit QIAquick (QIAGEN), a un volumen final de 75 µl.

Cuantificación de ADN

Los extractos se cuantificaron con el kit Quantifiler™ Trio (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante [110], en un equipo QuantStudio™ 5 (ThermoFisher). También se utilizaron los datos de cuantificación obtenidos en el Experimento #3 para ampliar la comparativa.

Amplificación de ADN

Las muestras se amplificaron con tres kits comerciales de STRs autosómicos: GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (ThermoFisher), PowerPlex® Fusion 6C (Promega) e Investigator® 24Plex QS Kit (QIAGEN). Las reacciones se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante [111–113], añadiéndose en todos los kits el mismo volumen de extracto de ADN (15 µl). La electroforesis capilar se hizo en un equipo ABI 3500 siguiendo las recomendaciones de cada fabricante, analizándose los datos con GeneMapper® IDX 1.6.

Se analizaron cinco parámetros: (1) el número de alelos detectados (alelos con una altura mayor a la del umbral analítico, fijado en 50 RFU tras validación interna), (2) el número de alelos reportables (alelos con una altura mayor a la del umbral estocástico, fijado en 365 RFU tras validación interna), (3) RFU promedio, (4) ratio de altura de picos (PHR) siguiendo a Leclair *et al.* [114], y (5) el rendimiento de cada marcador, entendiendo como marcador reportable aquellos heterocigotos que superaban los 50 RFU PHR >0,6, u homocigotos de más de 365 RFU. Los marcadores de tipo amelogenina, Yindel, Y-STRs e indicadores de calidad no fueron considerados.

Con el fin de poder correlacionar los alelos obtenidos con la cantidad de ADN, se compararon los RFU de cada muestra con las cantidades de ADN de las mismas obtenidas por qPCR siguiendo la fórmula propuesta por Gill, Bleka and Fonnelløp [115]. Para ello, se amplificaron 6 muestras de ADN prístino (DNA Control 007 0.1 ng/ µL, Applied Biosystems) con cada kit comercial, calculándose los RFU promedio en 1 ng de ADN (a). El promedio de RFU de una muestra permite el cálculo de la cantidad de ADN de partida con la siguiente expresión:

$$\text{Cantidad de ADN} = \frac{\overline{\text{RFU}}}{a} \cdot \text{Volumen de elución}$$

Análisis de datos

Los análisis de significación estadística de los resultados se hicieron con el software jamovi 2.2.5 [116].

6.2. Resultados y discusión

Los resultados de los perfiles genéticos se presentan en la **Tabla 7** y en la **Figura 12**. En la **Figura 13** se muestran los resultados por muestra. Después de procesar los datos eliminando aquellos concernientes a marcadores que no fueran de tipo STR autosómico, los tres kits detectaron la

misma cantidad de alelos (aquellos que superan los 50 RFU). De estos, un 62% supera el umbral estocástico (365 RFU), siendo este porcentaje ligeramente mayor en el caso de Investigator® 24Plex QS (65,5%). El kit de QIAGEN fue el más sensible, con un promedio de 4414 RFU, aproximadamente un 35% más que los otros dos, que alcanzaron relativamente la misma intensidad de fluorescencia. La ratio de altura de picos también resultó la misma entre los kits, 0,7 en promedio. Finalmente, los kits de ThermoFisher y Promega tuvieron el mismo número de marcadores reportables en promedio (14), alcanzando el kit de QIAGEN uno más (15).

Tabla 7. Promedio y coeficientes de variación cuartílicos de las variables estudiadas en los perfiles por kit comercial

	GlobalFiler™	PowerPlex® Fusion 6C	Investigator® 24Plex
Alelos >UA	29	29	29
CQV	0.19	0.15	0.15
Alelos >UE	18	18	19
CQV	0.32	0.27	0.25
RFU	3570	3259	4414
CQV	0.7788	0.8269	0.7911
PHR	0,7	0.7	0.7
CQV	0.06	0.04	0.05
Loci reportable	14	14	15
CQV	0.17	0.20	0.16

En promedio, no hubo diferencias significativas entre los kits a la hora de amplificar ADN de este nivel de degradación. Aunque el kit Investigator® 24Plex fue el más sensible, obteniendo en promedio 1000 RFU más que los otros kits, no se observaron diferencias significativas entre los kits en cuanto al número de alelos detectados, los que superaban el umbral estocástico, o los marcadores reportables. Esta mayor sensibilidad del kit de QIAGEN podría ser explicada por el tiempo de inyección (30 segundos) si lo comparamos con los recomendados para GlobalFiler™ y PowerPlex® Fusion 6C (15 segundos). El coeficiente de variación cuartílico sugiere que GlobalFiler™ tiene unas alturas de picos más consistentes.

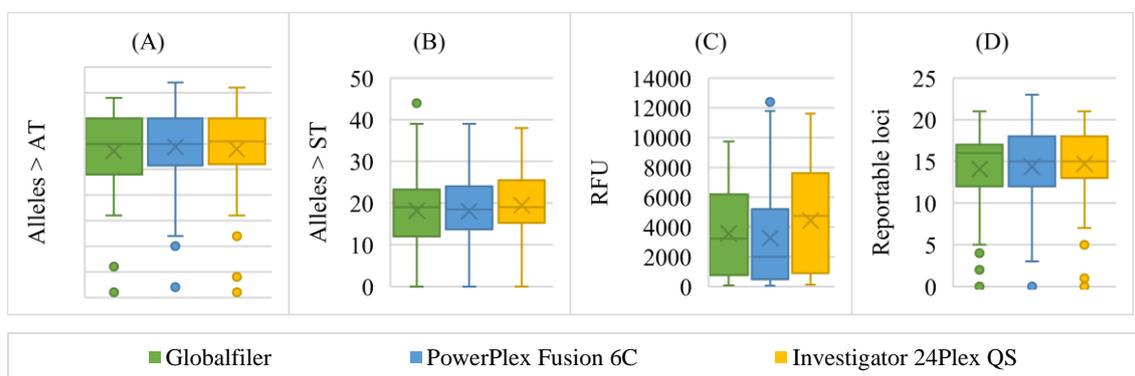


Figura 12. Diagramas de caja de los parámetros de los electroferogramas por kit comercial: alelos que superan el umbral analítico (A), alelos que superan el umbral estocástico (B), RFU promedio (C), y marcadores reportables (D). Al igual que en la Tabla 8, se observa que todos los kits tienen aproximadamente el mismo comportamiento.

Un examen a mayor profundidad no muestra correlación estadística entre el kit comercial y las variables analizadas (número de alelos reportables, número de alelos con altura mayor a la

del umbral estocástico, RFU promedio, PHR, y número de marcadores reportables obtenidos), siendo todos los p-valores en la prueba ANOVA de Welch y la prueba post-hoc de Tukey mayores que 0,05.

Un estudio de QIAGEN con 5 muestras de restos óseos comparó la eficiencia de GlobalFiler™, Investigator® 24Plex y PowerPlex® Fusion 6C, siendo el kit de ThermoFisher el que más alelos reportables tenía [117,118]. Los sensors de calidad (QS1 y QS2) incorporados en el kit Investigator® 24Plex QS se observaron como especialmente valiosos para este tipo de análisis al confirmar la ausencia de inhibición en muestras de perfil negativo, como ya se había anotado [119].

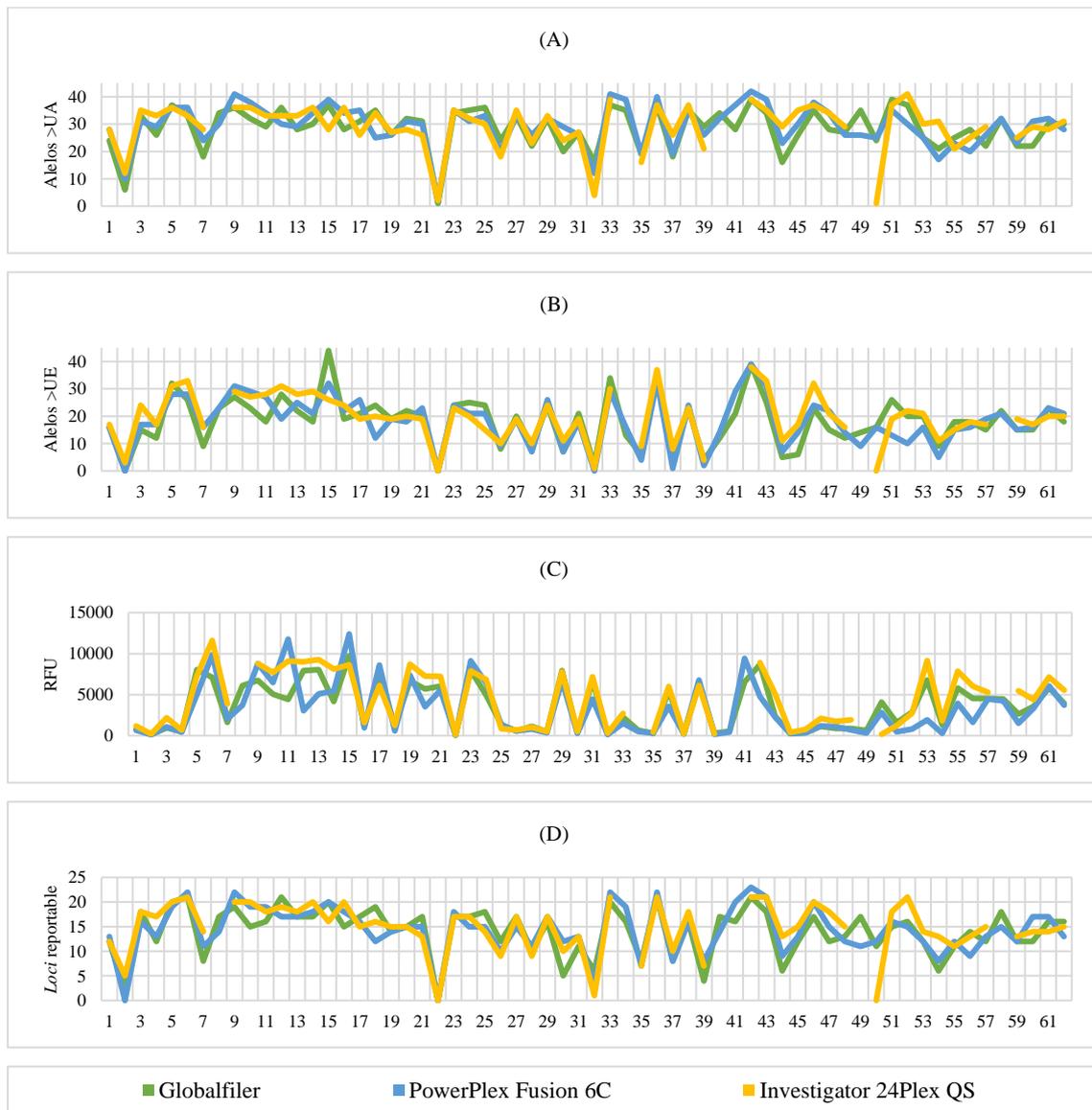


Figura 13. Gráficos los parámetros de amplificación estudiados por kit comercial y por muestra: alelos que superan el umbral analítico (A), alelos que superan el umbral estocástico (B), RFU promedio (C), y marcadores reportables (D). No se observan grandes diferencias entre los kits

Otro estudio, realizado con muestras de casuística forense, midió la eficiencia de estos kits con diversas condiciones, incluyendo ADN de poca cantidad, degradación e inhibición [120]. GlobalFiler™

superó a los otros dos kits a la hora de producir perfiles con poca cantidad de ADN, siendo PowerPlex® Fusion 6C mejor que Investigator® 24Plex en este punto. Lo mismo se aplica al ADN degradado (en este caso utilizaron ADN genómico tratado con DNasa I), superando esta vez el kit de QIAGEN ligeramente al de Promega. Finalmente, el kit GlobalFiler™ fue el peor kit a la hora de funcionar con inhibidores, mientras que los kits de QIAGEN y Promega rendían bastante bien en este sentido [120]. Otro estudio encuentra que GlobalFiler™ es que alcanza valores más altos de RFU en promedio, además de en número de marcadores reportables y en PHR, mientras que Investigator® 24Plex era el que mejor funcionaba en presencia de inhibidores [121]. El único estudio realizado con restos humanos en la literatura científica compara GlobalFiler™ e Investigator® 24Plex, observando que el primero obtenía mejores perfiles que el segundo al tener una mayor sensibilidad [122]. En este sentido nuestra investigación difiere en estas observaciones, encontrando al kit Investigator® 24Plex QS más sensible que los habitualmente señalados por los estudios vistos, GlobalFiler™ y PowerPlex® Fusion 6C.

En la **Figura 14** se muestra el rendimiento de cada marcador por kit comercial. Como es de esperar en este tipo de muestras, la amplificación de los marcadores más pequeños, los primeros de cada canal, está más presente, mientras que la amplificación de los últimos *loci* generalmente falla, resultando en ese perfil de pendiente de esquí característico. Las muestras que dan un perfil negativo o parcial en un kit lo dan también con los otros, por lo que no hay ninguna panacea.

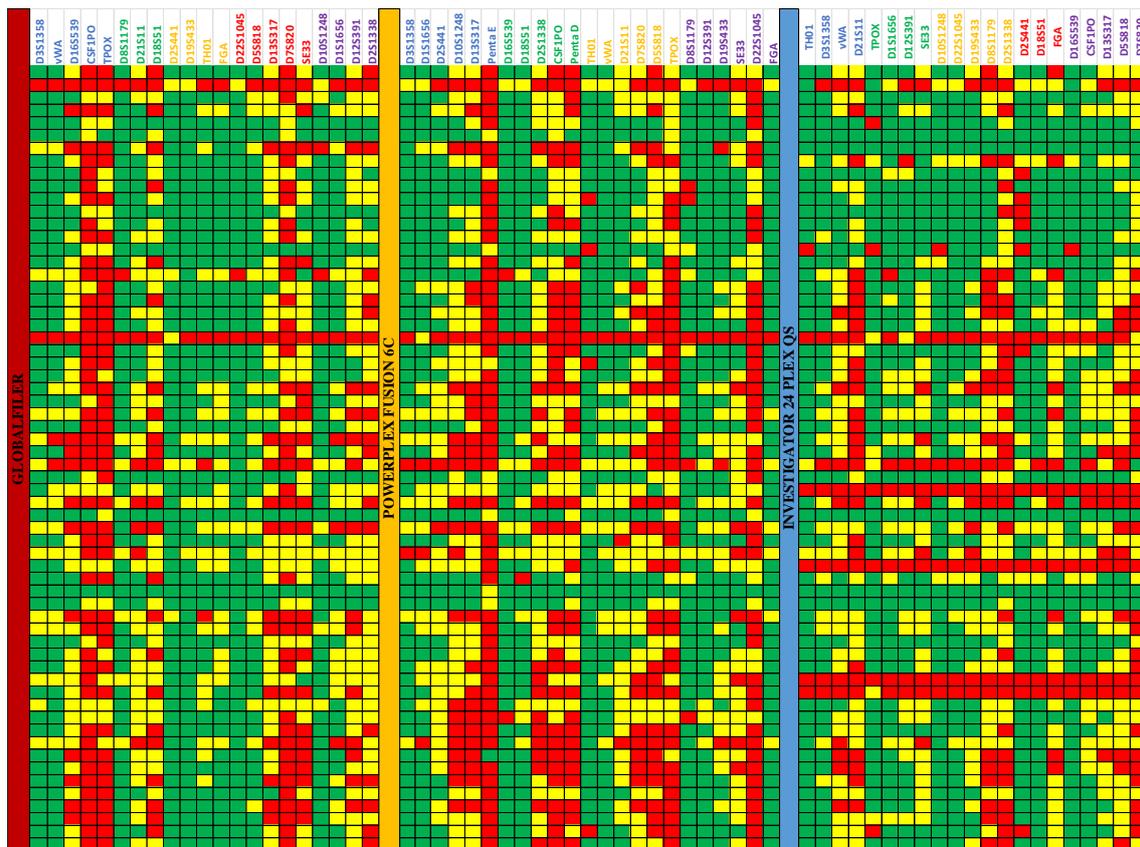


Figura 14. Mapa de calor de los diferentes marcadores por kit (en rojo: drop-out de locus, en amarillo, drop-out de alelo, en verde, marcador reportable).

No obstante, la **Figura 14** muestra la ventaja de utilizar más de un kit comercial cuando se analizan este tipo de muestras. Por ejemplo, si solamente se analizasen con GlobalFiler™ y se obtuviesen los dos

primeros marcadores de cada canal, se obtendrían unos 8 marcadores reportables. Si lo combinamos con PowerPlex® Fusion 6C, ese número aumentaría a 12, y si se añade 24Plex, hablaríamos de 15 marcadores reportables. Esta estrategia puede ser la diferencia entre un perfil no reportable y un perfil reportable.

Finalmente, si unimos estos resultados a los expuestos en el Experimento #3, podemos plantearnos cuál es la mejor combinación de kit de cuantificación y amplificación para el trabajo con restos humanos críticos. El objetivo sería determinar qué kit predice con más exactitud que se va a obtener un perfil genético completo, parcial o negativo, lo que permitiría un replanteamiento de las estrategias de amplificación o secuenciación de las muestras, o incluso su re-extracción si se prevé un resultado negativo.

En la **Figura 15** la diana corta de cada kit de cuantificación se ha comparado con el número de marcadores reportables obtenidos por cada kit. De estos diagramas se pueden deducir tres cosas: en primer lugar, una correlación positiva entre la cantidad de ADN y el número de marcadores obtenidos; en segundo lugar, en muchos casos en los que los valores de cuantificación son cercanos a cero, se obtiene un perfil parcial o incluso completo, lo que pone en tela de juicio e valor predictivo de la cuantificación por qPCR; en tercer lugar, se puede establecer qué parejas son las mejores por cómo de juntos están los puntos, lo que puede verse en los casos en los que se utiliza InnoQuant™ como kit de cuantificación.

Analizando esto con más detalle, en la **Tabla 8** se muestran los falsos negativos (muestras con valores de cuantificación menores a 50 pg, el mínimo teórico establecido por el fabricante para el kit, y un número de marcadores reportables mayor a 10; y los falsos positivos (muestras con valores de cuantificación mayor a 50 pg y un número de marcadores reportables menor a 10) [123].

Tabla 8. Falsos negativos (número de muestras con menos de 50 pg y más de 10 marcadores reportables) y falsos positivos (número de muestras con más de 50 pg y menos de 10 marcadores reportables) por pareja de kits

Kits	Falso negativo	GlobalFiler™	PowerPlex® Fusion 6C	Investigator® 24Plex QS	Falso positivo	GlobalFiler™	PowerPlex® Fusion 6C	Investigator® 24Plex QS
		Quantifiler™ Trio	26%	27%		23%	3%	3%
PowerQuant®	26%	27%	23%	3%	3%	2%		
Quantiplex® Pro	29%	31%	26%	3%	3%	2%		
InnoQuant™	13%	15%	11%	3%	3%	2%		

Mientras que Quantifiler™ Trio y PowerQuant® funcionan de una manera similar con cualquier kit de STRs autosómicos, Investigator® Quantiplex® Pro fue el kit con mayor número de falsos negativos, siendo InnoQuant™ HY Fast el kit de qPCR que menor número de falsos negativos arrojaba, especialmente su combinación con Investigator® 24Plex QS con sólo un 11%.

Finalmente, podemos comparar la cantidad de ADN obtenida en la cuantificación con la estimada por el método de \overline{RFU} descrito más arriba. Si obtenemos una ratio de estas dos cantidades, las más bajas mostrarán la mejor combinación de kits, lo que vuelve a colocar a InnoQuant™ HY Fast e Investigator® 21Plex QS como el mejor tándem con una ratio del 4%, seguido por InnoQuant™ HY Fast y PowerPlex® Fusion 6C (6%), (7% en su combinación con GlobalFiler™), y Quantifiler™ Trio e Investigator 24Plex (9%), dando el resto de las parejas unas ratios del 15-23%.

Se observó correlación estadística por el coeficiente de Pearson entre todas las variables de cuantificación y amplificación, excepto entre las parejas índice de degradación-alelos que superan el umbral analítico, alelos que superan el umbral estocástico, RFU promedio, PHR, número de marcadores reportables y diana corta. Esto es interesante teniendo en cuenta que el índice de degradación puede no ser tan informativo si se compara con la probabilidad de degradación, P(deg), como vimos [124].

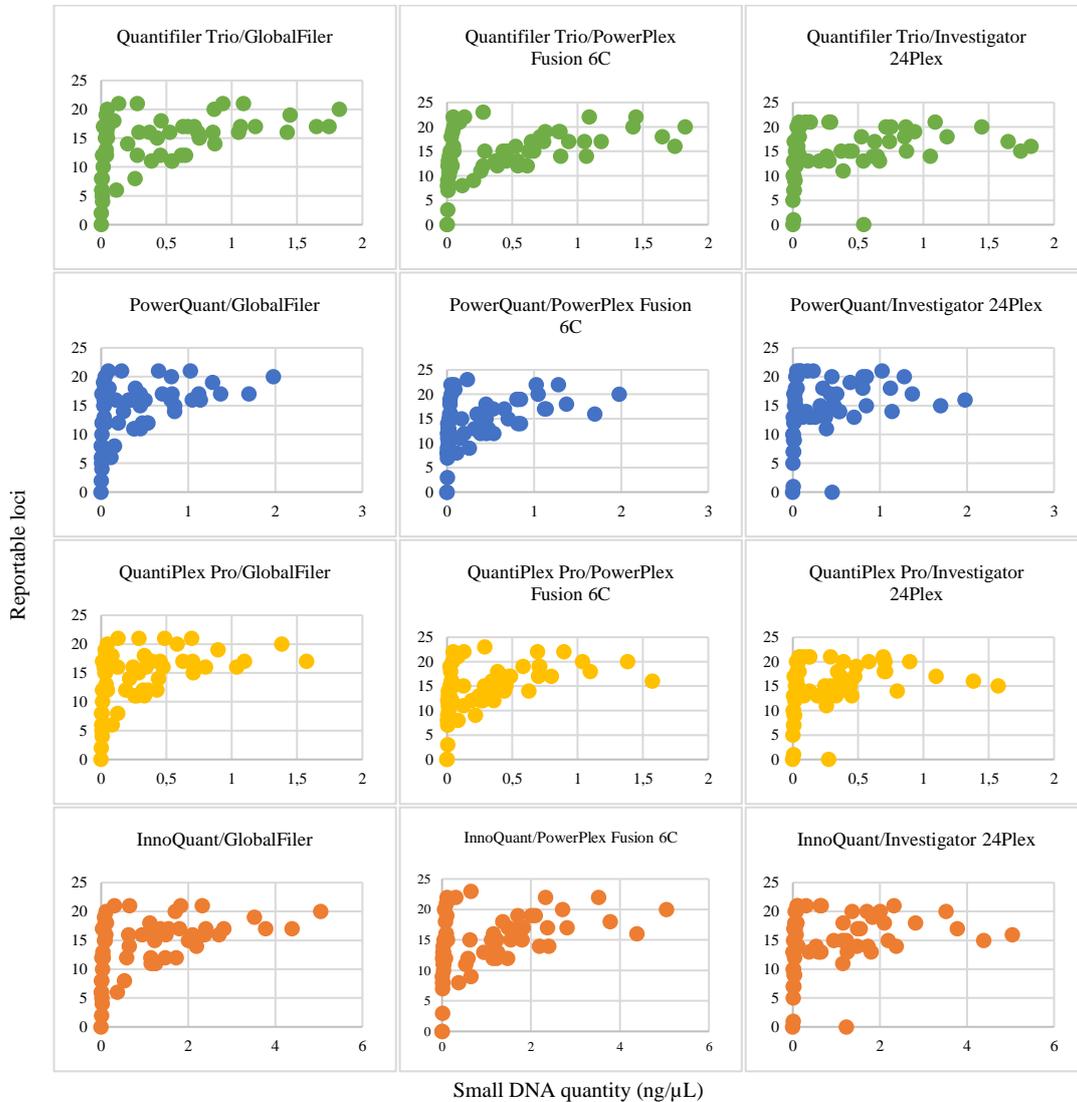


Figura 15. Diagrama de dispersión de la cantidad de ADN obtenida por qPCR en la diana pequeña y la cantidad de ADN estimada con el método de \overline{RFU} . Se observa una correlación positiva entre ambas variables. Cuanto más cercana es la ratio entre ambas variables a 1, mejor es el tándem de qPCR/auSTRs que forman.

La obtención de un perfil parcial o incluso un perfil completo en muestras con resultados de cuantificación bajos es algo que ya se observó en una evaluación hecha con Quantifiler™ y Profiler™ Plus, obteniendo un 27% de falsos negativos [125] (curiosamente, un resultado bastante similar al obtenido en este estudio para GlobalFiler™ y Quantifiler™ Trio). En otro estudio PowerQuant® se señaló como mejor kit que Quantifiler™ Duo, Plexor® HY e Investigator® Quantiplex HYres a la hora de dar falsos negativos [126], mientras que en nuestro ensayo los kits de ThermoFisher y Promega tuvieron un rendimiento similar. Teniendo esto en cuenta, se ha llegado a sugerir que se usen dos kits de cuantificación diferentes para medir con precisión el ADN contenido en muestras

críticas de restos óseos [127]. En definitiva, aunque en los últimos años se han producido avances en la sensibilidad de los kits de auSTRs, es necesario que la tecnología de los kits de qPCR mejore para aumentar su valor predictivo.

Otro estudio conseguía buenas predicciones del perfil genético de auSTRs a partir de los datos de cuantificación en restos de la II Guerra Mundial con los kits PowerQuant® y AmpFISTR™ NGM [128], señalando lo que Promega anunciaba con su kit de que cero nanogramos de ADN significan cero marcadores. Esto fue confirmado con una muestra que verdaderamente obtuvo 0 ng de ADN en cuantificación y un perfil negativo; sin embargo, se obtuvieron perfiles parciales con muestras con 0,004-0,008 ng/ µl.

En definitiva, el objetivo de este estudio no era probar la química de cada kit de qPCR y de amplificación de auSTRs probándolos con los mismos parámetros de amplificación e inyección (modificaciones que no están validadas por el fabricante, que precisamente optimiza los kits para funcionar con esos parámetros), sino evaluar la eficiencia de los protocolos actuales de cuantificación por qPCR y amplificación de auSTRs bajo las condiciones recomendadas a la hora de analizar restos humanos críticos. En otras palabras, comparar el funcionamiento de los diferentes kits con las mismas cantidades de ADN de restos humanos críticos.

6.3. Conclusiones

El análisis de restos óseos y dientes críticos resulta especialmente desafiante debido a la pequeña cantidad de ADN que contienen y su degradación, lo que exige una revisión constante de las estrategias analíticas.

Este estudio comparó la eficiencia de los tres kits comerciales de STRs autosómicos de 6 colores más utilizados en el ámbito forense (GlobalFiler™, PowerPlex® Fusion 6C e Investigator® 24Plex QS) en un total de 62 muestras de restos humanos críticos (hueso petroso, dientes, fémur y tibia). Hay pocas comparativas como esta en la literatura, señalando normalmente a GlobalFiler™ y PowerPlex® Fusion 6C como los mejores en términos de marcadores reportables.

En nuestro estudio los tres kits tuvieron un rendimiento similar, obteniéndose un marcador reportable más en promedio con Investigator® 24Plex, cuyos picos tenían aproximadamente 1000 RFU más en promedio.

Para comparar los kits de cuantificación y amplificación con la finalidad de obtener el mejor tándem, se estimó la cantidad de ADN a partir de los datos de RFU siguiendo el método propuesto por Gill *et al.* [115], comparando estos valores con los obtenidos por la diana corta de cada kit de qPCR. InnoQuant® HY Fast e Investigator® 24Plex QS fueron los kits con menor dispersión entre estos valores (4%), seguido por InnoQuant® HY Fast y PowerPlex® Fusion 6C (6%) y a su vez con GlobalFiler™ (7%). Una buena correlación entre los valores de cuantificación y el perfil genético obtenido constituye una herramienta valiosísima para los laboratorios forenses, permitiendo reconsiderar estrategias.

7. Experimento #5. Comparativa de kits comerciales de STRs del cromosoma Y en restos óseos críticos

Este experimento tiene el objetivo de comparar la eficiencia de tres kits de Y-STRs (Yfiler™ Plus, PowerPlex® Y23, e Investigator® Argus Y-28 QS) en la amplificación de restos humanos críticos procedentes de fosas comunes, evaluar la aplicabilidad del recientemente diseñado Argus Y-28 QS para este tipo de muestras, y establecer si es posible la predicción del éxito del perfil de Y-STRs a partir de un perfil de auSTRs.

7.1. Material y métodos

Todos los procedimientos que se describen a continuación se han llevado a cabo en unas instalaciones para muestras mínimas de ADN, siguiendo las recomendaciones internacionales para el trabajo con ADN antiguo [129,130]. Las medidas de prevención de la contaminación incluyeron la esterilización de la sala con luz UV, presión positiva con filtro HEPA, material estéril, y limpieza de superficies con DNAZap™. Las medidas de monitoreo de la contaminación incluyeron controles negativos de extracción, cotejo de los perfiles obtenidos con los del personal del laboratorio, datos de cuantificación bajos, índice de degradación alto, y perfil en “pendiente de esquí”.

Preparación de las muestras

Se analizaron un total de 63 muestras de restos humanos de fosas comunes de Andalucía (véase la **Tabla 9**). Las muestras estuvieron enterradas a una profundidad de 3-4 metros en fosas comunes durante 70-80 años en la región Oeste de Andalucía, caracterizada por un suelo con pH ácido [105] y temperaturas en verano de hasta 45°C [106]. Las muestras fueron lijadas con una Dremel®, cortándose los huesos en fragmentos. Dientes y fragmentos fueron pulverizados en un TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Tabla 9. Muestras para la comparativa de kits de Y-STRs

	Dientes	Fémur	Tibia	Cúbito	Total
N	30	21	10	2	63

Extracción de ADN

El ADN de las muestras fue extraído utilizando un protocolo interno de extracción basado en el protocolo de extracción orgánica [131]: 5 mL de tampón de extracción (compuesto por EDTA 0,5M, proteinasa K 10 mg/mL, SDS 10% y DTT 1M) se añadieron a 1.0 g de pulverizado, incubándose toda la noche a 56°C; el lisado se mezcló con 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y el sobrenadante se concentró con filtros Amicon Ultra-4 de 30 kDa (Merck KGaA), purificándose con MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN).

Cuantificación de ADN

Los extractos de ADN ya purificados se cuantificaron con el kit de qPCR Quantifiler™ Trio en un equipo QuantStudio™ 5 (ThermoFisher), siguiendo las recomendaciones del fabricante [110].

Amplificación de ADN

Para la amplificación de Y-STRs se tomaron muestras previamente analizadas con GlobalFiler™, siguiendo las recomendaciones del fabricante [111] y utilizando un volumen de 15 µL de extracto de ADN en la reacción. Una vez confirmado el sexo de la muestra por el marcador amelogenina, cada extracto se amplificó con tres kits de Y-STRs: Yfiler™ Plus (ThermoFisher), PowerPlex® Y23 (Promega), e Investigator® Argus Y-28 QS (QIAGEN). Las amplificaciones se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante [49–51], utilizando en los tres casos el mismo volumen de ADN para la homogeneidad del experimento (10 µL). Los fragmentos se analizaron en un ABI 3500 (ThermoFisher), siguiendo para las carreras las instrucciones del manual de cada kit.

Análisis de datos

Los datos de la electroforesis se analizaron con GeneMapper™ IDX v1.4. Los análisis estadísticos (descriptivos, coeficiente de variación cuartílico [132], prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, ANOVA y regresión) se hicieron con jamovi 2.2.5 [116].

7.2. Resultados y discusión

En la **Tabla 10** se muestran los resultados de los perfiles genéticos, incluyendo el número de alelos con una altura mayor a la del umbral analítico (>UA), establecido en 100 RFU tras validación interna, RFU, PHR, y el número de loci reportables (marcadores con alelos de más de 100 RFU y, en el caso de que los marcadores bialélicos sean monocigotos, 370 RFU).

Tabla 10. Resultados promedio y coeficiente de variación cuartílico (CQV) por kit comercial

Parámetro	Yfiler™ Plus	PowerPlex® Y23	Argus Y-28
Alelos >UA	11	13	11
CQV	0.524	0.283	0.571
RFU	307	750	355
CQV	0.493	0.647	0.577
PHR	0.8	0.7	0.7
CQV	0.131	0.144	0.154
Loci reportable	10	12	10
CQV	0.500	0.280	0.590

PowerPlex® Y23 fue el kit comercial con mayor número de alelos detectados, seguido por Yfiler™ Plus y, con el mismo número, Argus Y-28. La ratio de altura de picos fue aproximadamente la misma para los tres kits. En RFU promedio vuelve a haber un empate entre los kits de ThermoFisher y QIAGEN, obteniendo el de Promega dos veces más, lo que coadyuva a que, en promedio, el kit PowerPlex® Y23 fue el que más marcadores reportables consiguió (12),

seguido por los otros dos kits de la comparativa (10). Además, el kit de Promega fue el que menos dispersión mostró en el número de alelos detectados y el número de marcadores reportables, lo que habla en favor de su precisión (véase la **Figura 16**).

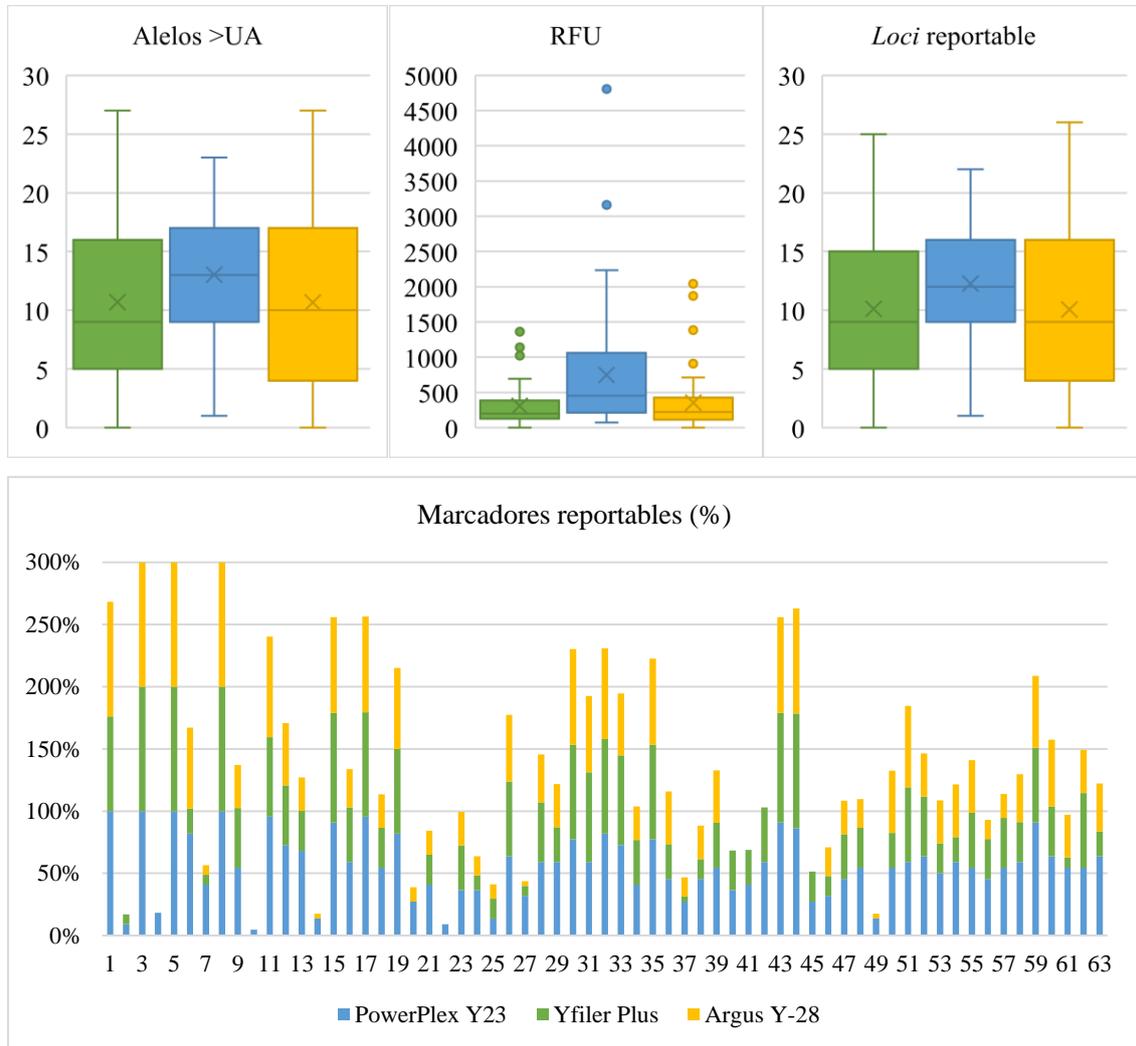


Figura 16. Arriba, diagramas de caja de los alelos que superan el umbral analítico (UA), los RFU, y el número de marcadores reportables. Abajo, gráfico de barras con el número de marcadores reportables por kit y por muestra

Tanto Yfiler™ Plus como Argus Y-28 tuvieron un comportamiento similar en cuanto a número de alelos reportables y valores de RFU, teniendo también en promedio el mismo número de marcadores reportables. Esto sugiere que el kit Argus Y-28, recientemente desarrollado y que no ha sido validado sistemáticamente en la literatura para este tipo de muestras, es adecuado para la amplificación de Y-STRs de restos humanos críticos.

Teniendo en cuenta que la distribución de los datos no era normal (el p-valor de la prueba de Shapiro-Wilk era menor a 0,05) se realizaron pruebas no paramétricas. Se hizo la prueba de ANOVA de un factor con los kits comerciales como variable de agrupamiento, comprobando la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene. Así, a las variables >UA, RFU y loci

reportables (varianza no homogénea) se les hizo el ANOVA de un factor de Welch y la prueba *post hoc* de Games-Howell; a las variables PHR y % perfiles reportables se les hizo el ANOVA de un factor de Fisher y la prueba *post hoc* de Tukey. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los kits con respecto a los RFU y al porcentaje del perfil que se ha recuperado (p-valor <0,001). Las pruebas *post hoc* muestran que hay diferencias significativas entre PowerPlex® Y23 e Yfiler™ Plus (p-valor <0,001) y Argus Y-28 (p-valor =0,003) con respecto a los RFU, así como en el porcentaje de marcadores del kit recuperados (p-valor de 0,006 y 0,002). Esto refleja la importancia de normalizar los marcadores obtenidos con cada kit en forma de porcentaje con respecto a su total de marcadores posibles con el fin de comparar los resultados entre sí. Merece la pena notar que PowerPlex® Y23 funciona con una química de 5 colores, mientras que los otros funcionan con 6, teniendo 3-4 marcadores menos que los otros kits. Yfiler™ Plus y Argus Y-28 no tuvieron diferencias estadísticas significativas entre ellos con respecto a ninguno de los parámetros analizados.

Hay pocos estudios en la literatura que comparen la eficiencia de estos kits, y mucho menos en este tipo de muestras críticas. Un estudio encontró que PowerPlex® Y23 es el más sensible, particularmente con cantidades bajas de ADN [52], mientras que otra comparativa, realizada por QIAGEN, encontró que Argus Y-28 es capaz de recuperar más alelos en presencia de inhibidores como el calcio o el ácido húmico [133]. También refleja la utilidad de los indicadores de calidad del kit Argus Y-28, que ayudan a confirmar que un resultado negativo no se debe a la presencia de inhibidores, algo particularmente útil en este tipo de muestras.

En la **Figura 2** se muestra un mapa de calor con el desempeño de cada marcador de los diferentes kits, lo que ayuda a explicar las diferencias observadas entre PowerPlex® Y23 y el resto de kits en cuanto al desempeño en el momento en que observamos que se han amplificado correctamente más marcadores de cada canal. Esto sugiere que el kit de Promega de alguna manera es menos susceptible a la degradación, pues si trazamos un umbral de 250 pb este kit es el que menor número de marcadores tiene en ese rango. Además, debe notarse que el kit de Promega es el que menos *drop-out* exhibe en los marcadores bialélicos. Esto puede deberse al diseño de los cebadores del kit, pues los problemas de inhibición pueden descartarse teniendo en cuenta que el proceso de extracción incluye una purificación de los extractos, así como los valores del ciclo umbral del IPC en la cuantificación y los sensores del Argus Y-28.

El poder de combinar dos o más kits en una muestra con resultado parcial con uno de ellos también debe considerarse, como se ha señalado previamente [134]. Por ejemplo, si únicamente se consiguiesen amplificar correctamente los dos primeros marcadores de cada canal (un umbral de, aproximadamente, 250 pb), los marcadores conseguidos por un kit podrían confirmarse con el uso de un kit complementario, además de aumentar el número de marcadores

reportables. Así, si utilizásemos Yfiler™ Plus como kit comercial principal y PowerPlex® Y23 como kit complementario, y conseguimos con el primero 10 marcadores reportables, confirmaríamos 5 de ellos y aumentaríamos en 3 el número de marcadores de un eventual perfil consenso.

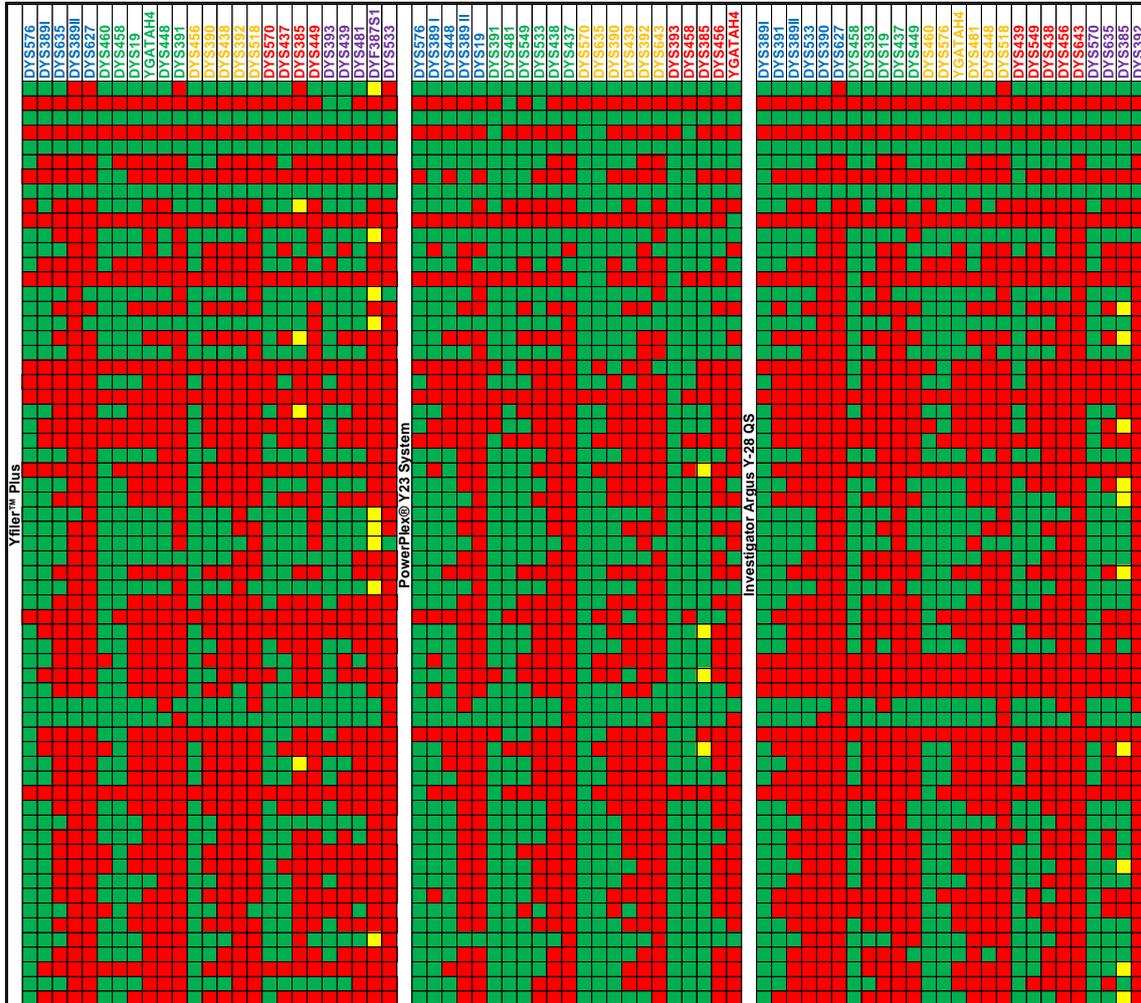


Figura 17. Mapa de calor de los tres kits comerciales probados por marcador. En verde: marcadores amplificados con éxito. En rojo: marcadores fallidos. En amarillo: marcadores bialélicos en los que no puede excluirse el *drop-out*

Otro objetivo de este estudio era comprobar si es posible predecir el éxito de una eventual amplificación de marcadores Y-STRs a partir de un perfil de auSTRs. Para ello se tomaron tres parámetros de cuantificación (cantidades de ADN detectadas en la diana pequeña, diana grande y diana masculina, clústeres mostrados en la **Tabla 11**) y cuatro parámetros del perfil de auSTRs del kit GlobalFiler™ (número de alelos detectados considerando un UA de 50 RFU, número de alelos que superan un UE de 365 RFU, RFU promedio en auSTRs, y número de marcadores de tipo auSTRs reportables, clústeres mostrados en la **Tabla 12**).

Considerando los datos de cuantificación, aproximadamente el 50% de las muestras que se analizaron tuvieron un perfil parcial de Y-STRs teniendo, al menos, 0,005 ng/μl de partida,

pudiendo establecer el umbral de sensibilidad de los kits probados en 50 pg. El porcentaje de éxito asciende al 80% en el caso de PowerPlex® Y23, lo que refuerza la idea de la mayor sensibilidad de este kit [52]. Si usamos el número de marcadores reportables alcanzado por GlobalFiler™, en la mayoría de los casos se obtendrán resultados de al menos 10 loci si se parten de muestras que tuvieron 11-15 marcadores auSTRs, bajando en el caso de PowerPlex® Y23 a 6-10 marcadores.

Tabla 11. Grupos de muestras por cantidad de ADN y, dentro de ese grupo, porcentaje de muestras que alcanzan 10 o más perfiles reportables de Y-STR, por kit comercial

Quantifiler™ Trio diana pequeña (ng/μL)	Yfiler™ Plus (≥10 loci)	PowerPlex® Y23 (≥10 loci)	Argus Y-28 (≥10 loci)
[0-0.005] (n=14)	0%	14%	0%
(0.005-0.05] (n=38)	47%	82%	50%
(0.05-0.1] (n=7)	86%	100%	86%
>0.1 (n=4)	100%	100%	100%

Tabla 12. Grupos de muestras por número de marcadores de auSTRs y, dentro de ese grupo, porcentaje de muestras que alcanzan 10 o más perfiles reportables de Y-STRs, por kit comercial

GlobalFiler™ loci	Yfiler™ Plus (≥10 loci)	PowerPlex® Y23 (≥10 loci)	Argus Y-28 (≥10 loci)
0-5 (n=10)	10%	10%	10%
6-10 (n=16)	6%	50%	19%
11-15 (n=15)	60%	100%	53%
16-21 (n=22)	77%	91%	77%

Con estas variables se creó una matriz de correlación, mostrando todas ellas correlación entre sí (p-valor <0,001), pero sin poder obtenerse un coeficiente de correlación aceptable de, al menos, 0,8. A pesar de haber probado haciendo una regresión logística multinomial, añadiendo y quitando variables en función del empeoramiento o mejoría del coeficiente de determinación (R²) obtenido, no se pudo obtener ningún modelo aceptable. Los mejores valores que se alcanzaron fueron de 0,565 para Yfiler™ Plus, 0,597 para PowerPlex® Y23, y 0,641 para Argus Y-28.

7.3. Conclusiones

El análisis de Y-STRs es ampliamente utilizado por los laboratorios forenses que analizan muestras críticas por sus ventajas a la hora de estudiar relaciones de familiaridad por línea paterna y por sus aplicaciones en el campo de la antropología molecular. En contextos como las grandes catástrofes o las fosas comunes demuestra ser una herramienta especialmente útil para las

identificaciones, especialmente en su combinación con los auSTRS, en casos en los que sólo se disponen parientes lejanos para hacer comparaciones.

Esta investigación pretendía comparar la eficiencia de tres kits comerciales de Y-STRs en el análisis de restos humanos críticos, así como evaluar la aplicabilidad el kit Investigator® Argus Y-28 en este tipo de muestras. Metodológicamente hablando, se utilizó la misma cantidad de ADN para la reacción de cada amplificación de cada kit, asegurando la homogeneidad de las muestras utilizadas, sin modificar las condiciones de amplificación o de electroforesis, teniendo en cuenta que los kits han sido validados para su uso forense con estos parámetros.

Los resultados sugieren que Investigator® Argus Y-28 funciona correctamente con muestras de restos humanos críticos, alcanzando prácticamente los mismos resultados en promedio que Yfiler™ Plus. Comparando los tres kits, PowerPlex® Y23 fue el que mejor rendimiento tuvo, alcanzando el doble de RFU y dos marcadores reportables más en promedio que los otros kits, lo que sugiere que el kit de Promega es más sensible y menos susceptible a la degradación del ADN, posiblemente por el diseño de cebadores. Finalmente, aunque no fue posible obtener un modelo de regresión satisfactorio, los datos muestran que se puede obtener un perfil parcial de Y-STRs si se parten de 50 pg de ADN, o de al menos 13 marcadores reportables de GlobalFiler™.

8. Experimento #6. Evaluación del uso del kit de INNULs InnoTyper® 21 en restos óseos críticos

Esta investigación tiene el objetivo de evaluar la utilidad de un kit de 20 marcadores INNULs en la identificación de restos humanos críticos, comparando los resultados obtenidos con los del kit de auSTRs GlobalFiler™ en 70 muestras de restos críticos, comparando, además de los parámetros de los perfiles, el poder de discriminación de los mismos.

8.1. Material y métodos

Los procedimientos que a continuación se describen se han llevado a cabo en una instalación dedicada a las muestras mínimas que sigue las recomendaciones internacionales de trabajo con ADN antiguo [102–104].

Muestras

Para la comparativa se ha seleccionado un total de 70 restos humanos (véase la **Tabla 13**) procedentes de fosas comunes de la Guerra Civil y la Posguerra de Andalucía, seleccionándose aquellas que previamente dieran un perfil negativo o parcial con GlobalFiler™. La superficie de las muestras se lijó con un taladro Dremel® [107], cortando los huesos en fragmentos y exponiendo fragmentos y dientes lijados a luz UV durante 10 minutos por cada lado [108]. Huesos y dientes se pulverizaron en un equipo TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Tabla 13. Muestras de restos humanos críticos para análisis con Innotyper@21 y GlobalFiler™

	Femur	Tooth	Humerus	Tibia	Ulna
N	43	9	9	7	2

Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo siguiendo un protocolo interno basado en la extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [131]. A 1,0 gramos de pulverizado se añadieron 5 ml de tampón de lisis con EDTA, SDS, DTT y proteinasa K, incubándose con rotación toda la noche a 56°C. El sobrenadante se mezcló con 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se concentró con filtros Amicon Utra-4 de 30 kDa (Merch KGaA, Darmstadt, Alemania). Los extractos se purificaron con columnas MinElute® PCR Purification Kit (QIAGEN).

Cuantificación de ADN

Los extractos se cuantificaron con el kit comercial de qPCR Quantifiler™ Trio (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), en un equipo de qPCR QuantStudio™ 5 (ThermoFisher), siguiendo las recomendaciones del fabricante [110].

Amplificación de ADN

Las muestras se amplificaron con el kit de auSTRs GlobalFiler™ (ThermoFisher) y con el kit de INNULs InnoTyper® 21 (InnoGenomics, Nueva Orleans, LA), siguiendo en ambos casos las recomendaciones específicas por el fabricante [67,111], utilizando en ambos casos el mismo volumen de extracto para la reacción (15 µl). Los fragmentos se analizaron en un equipo ABI 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher).

Análisis de datos

Los datos de electroforesis se analizaron con GeneMapper™ IDX v1.6, tomándose cuatro parámetros: 1) número de alelos detectados (altura mayor a 50 RFU en GlobalFiler™ y 85 RFU en InnoTyper® 21), 2) RFU promedio, 3) PHR promedio, y 4) número de marcadores reportables (estableciéndose un umbral estocástico de 360 RFU para GlobalFiler™ y 180 RFU para InnoTyper® 21, así como un PHR de 0,60 para el kit de auSTRs y de 0,76 para el kit de INNULs. Todos los umbrales se establecieron tras validación interna.

Los parámetros estadísticos (promedio, coeficiente de variación cuartílico [CQV], prueba de Shapiro-Wilk para normalidad, prueba de Levene para homogeneidad de las varianzas, ANOVA de un factor) fueron calculados con jamovi 2.2.5 [116].

Para evaluar el poder de discriminación de los perfiles obtenidos, se calculó el RMP (Random Match Probability) con el software Familias3 [135], utilizando las frecuencias alélicas del GHEP-ISFG de 2023 [136] y, para los INNULs, una base de datos de población andaluza previamente publicada [66].

8.2. Resultados y discusión

Los resultados de los perfiles genéticos, promedio y dispersión de los datos, se muestran en la **Tabla 14**. Más del 90% de las muestras dio un resultado bajo de cuantificación de la diana corta (véase los datos suplementarios), y aproximadamente el 85% de las muestras dieron 5 o menos marcadores reportables de auSTRS. Dentro de este grupo, el resultado del 32% era negativo (0 marcadores reportables). El mejor perfil de GlobalFiler™ (14 marcadores) fue obtenido con un total de 0,738 ng de ADN, mientras que el mejor de InnoTyper™ (19 marcadores) fue obtenido con 0,091 ng, apuntando a la mayor sensibilidad de este último.

Tabla 14. Resultados de los perfiles genéticos obtenidos con GlobalFiler™ e InnoTyper® 21

Kit		Alelos detectados	$\overline{\text{RFU}}$	PHR	Marcadores reportables
GlobalFiler™	\bar{x}	12	207	0,47	3
	CQV	0,648	0,429	1,000	1,000
InnoTyper® 21	\bar{x}	20	567	0,49	8
	CQV	0.415	0.511	0.277	0.625

En la **Figura 18** se muestran los diagramas de caja de las variables analizadas de los perfiles genéticos. En términos generales, InnoTyper® 21 supera a GlobalFiler™ en número de alelos detectados y RFU, alcanzando aproximadamente el doble en estos parámetros. La ratio de altura de picos (PHR) fue aproximadamente la misma para los dos kits.

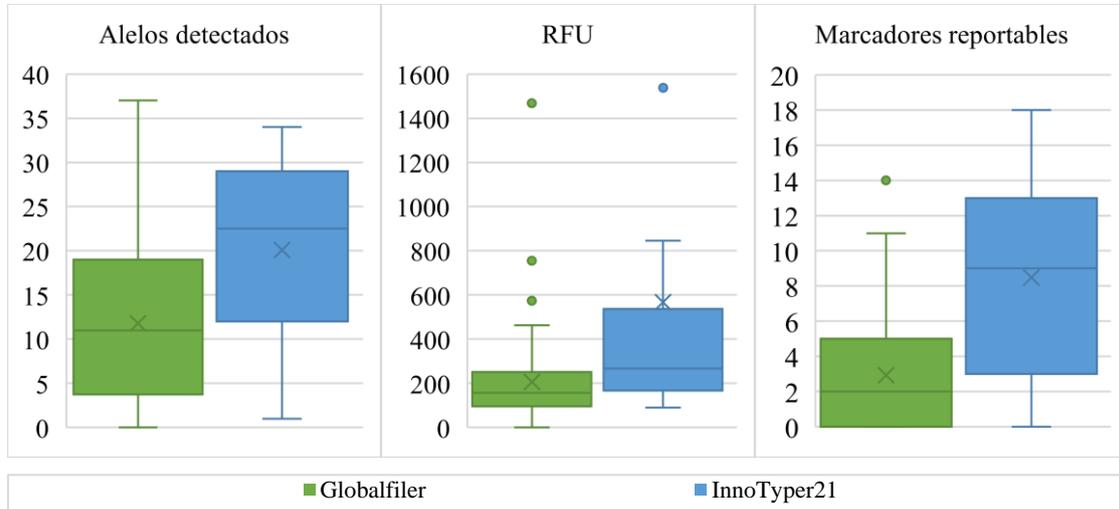


Figura 18. Diagramas de caja del número de alelos detectados, RFU y marcadores reportables de GlobalFiler™ e InnoTyper® 21

El promedio muestra que InnoTyper® 21 triplica el número de marcadores reportables conseguidos por GlobalFiler™. Si observamos la **Figura 19**, en la que se muestran los marcadores reportables obtenidos por muestra y por kit, vemos que de las 22 muestras con perfil negativo de auSTRs, 15 de ellas tuvieron un resultado positivo con InnoTyper® 21, si bien fue un perfil parcial en la mayoría de los casos. Generalmente, cuando se obtuvieron 5 o menos marcadores con GlobalFiler™, se alcanzó la mitad del perfil con InnoTyper® 21.

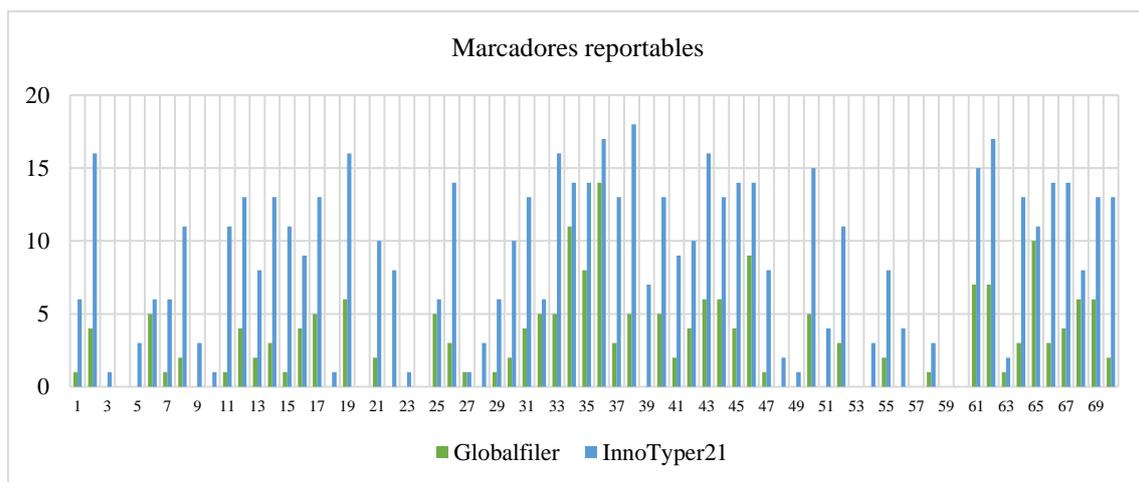


Figura 19. Gráfico de barras del número de marcadores reportables obtenidos por muestra y por kit

Tras las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, el ANOVA de un factor mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos kits con respecto al número de alelos detectados (p-

valor <0,001), el promedio de RFU (p-valor=0,003) y el número de marcadores reportables (p-valor <0,001), pero no para el PHR (p-valor=0,808).

Otros trabajos ya han apuntado que InnoTyper® 21 detectaba más alelos que los kits de auSTRs NGM™ [137] y GlobalFiler™ [68,138,139], dando mejores perfiles [138,139], y perfiles más informativos cuando no se alcanzaba ningún marcador con GlobalFiler™ [68,138]. Nuestros resultados están en la misma línea que estos hallazgos, habiéndose detectado más alelos y alcanzado un número mayor de marcadores reportables con el kit de InnoGenomics. No obstante, los resultados que obtuvimos en restos humanos no fueron tan espectaculares como los obtenidos por Martins *et al.* en su estudio [138], en el que pasaban de tener cero marcadores de auSTRs a un perfil completo de INNULs, si bien esta diferencia puede deberse al sustrato empleado, en su caso, muestras de casuística de pelos sin raíz.

Con todo, no hay muchos ejemplos en la literatura científica en los que se discuta, no ya la diferencia en cuanto al número de marcadores obtenidos por cada kit, sino la fuerza estadística de los resultados por uno y otro. Para hacer esto, se calculó el RMP de cada perfil de GlobalFiler™ e InnoTyper® 21 con el software Familias 3, cuyos resultados se muestran en la **Figura 20**.

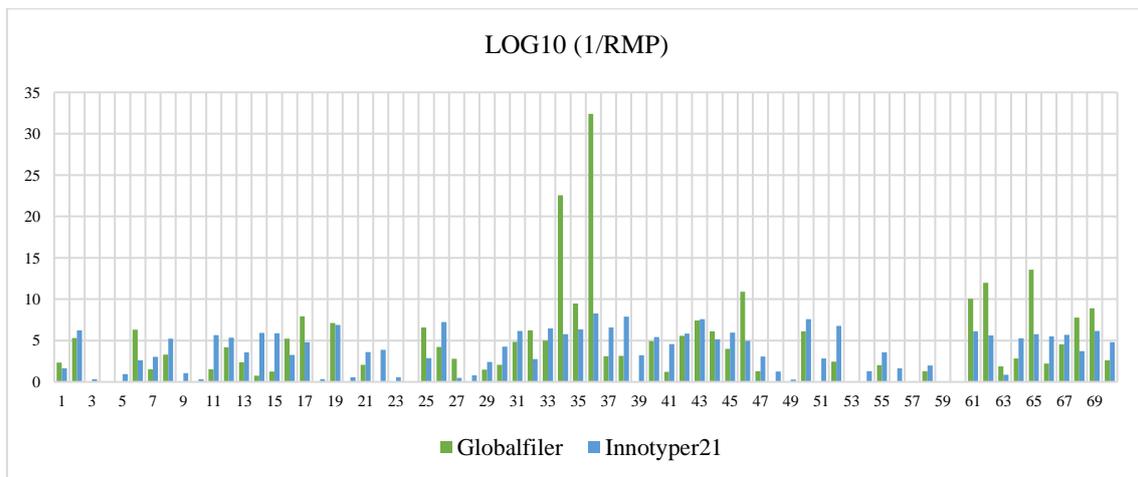


Figura 20. Gráfico de barras del logaritmo de la razón de verosimilitud (1/RMP) de cada muestra por kit comercial.

Si se comparan los gráficos de la **Figura 19** y la **Figura 20** se puede observar que ciertamente InnoTyper® 21 consigue más marcadores, pero su poder de discriminación se equilibra con respecto a los obtenidos por GlobalFiler™ en esa misma muestra. De hecho, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con ANOVA de un factor (p-valor=0,321).

En una prueba realizada por InnoGenomics con muestras sonicadas amplificadas con InnoTyper® 21, se concluyó que se alcanzaban mayores valores de LR cuando los fragmentos de ADN era inferiores a 150 pb comparados con los valores de LR obtenidos por GlobalFiler™

[140]. Nuestra investigación apoya esa idea, pues InnoTyper™ supera a GlobalFiler™ en poder de discriminación cuando con este último kit se conseguían 5 o menos marcadores.

Este es el motivo por el que varios autores han sugerido el valor de InnoTyper® 21 como complemento a los kits de STRs autosómicos [68,137,141], llegando a sugerir que los INNULs podrían tener un poder de discriminación mayor que el del mtDNA [138].

En este sentido, un último punto a discutir es de qué manera pueden combinarse los LRs obtenidos con GlobalFiler™ e InnoTyper® 21. Este tema ha sido ampliamente discutido en la literatura, con dos posiciones predominantes: una que aboga por no combinar los LR de evidencias de ADN diferentes [142], y otra que apoya la idea de combinarlos siguiendo la regla de producto [143], cuya base matemática se ha ido refinando con el tiempo [144]. La clave está en la demostración de que los INNULs y los STRs no están sujetos a ligamiento, cuestión que la literatura disponible todavía no ha resuelto. Sin embargo, si hacemos unos cálculos superficiales con la información de las localizaciones de los marcadores recogidas en las guías de los kits, vemos que se obtiene una fracción de recombinación de Kosambi [145] muy baja entre AC4027 y D7S820, TARBP y D1S1656, y NBC106 y FGA

8.3. Conclusiones

Este experimento tenía como objetivo evaluar la aplicabilidad de InnoTyper® 21 para el análisis de restos humanos críticos, así como estimar su poder de discriminación con respecto al perfil obtenido con auSTRs. Para ello se analizaron con este kit 70 muestras de restos óseos y dientes críticos que previamente dieron un resultado parcial o negativo con GlobalFiler™.

Los resultados muestran que InnoTyper® 21 alcanzó una mayor cantidad de alelos detectados, valores de RFU más altos y más cantidad de marcadores reportables que GlobalFiler™ en cada muestra. Sin embargo, si se comparan ambos perfiles, el valor de LR que se obtiene de cada uno es relativamente similar.

En conclusión, InnoTyper® 21 se constituye como una poderosa herramienta complementaria a la hora de afrontar resultados negativos o parciales de muestras desafiantes.

9. Referencias

- [1] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction, in: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986: pp. 263–273.
- [2] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Academic Press, San Diego, 2010.
- [3] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden, Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics* 13 (2012) 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- [4] Smithsonian, The History of PCR (RU 9577), Smithsonian Institution Archives (2004). http://siarchives.si.edu/research/videohistory_catalog9577.html.
- [5] J.M. Butler, *Forensic DNA Typing*, Second Edi, Elsevier, Burlington, 2005.
- [6] H. Fan, J.Y. Chu, A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation, *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 5 (2007) 7–14. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60009-6).
- [7] J.M. Butler, Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing, *Journal of Forensic Sciences* 51 (2006) 253–265. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x>.
- [8] P. Shrivastava, H.R. Dash, R.K. Kumawat, A. Srivastava, J. Imam, STR Typing and Available Kits, in: H.R. Dash, Pankaj Shrivastava, Braja Kishore Mohapatra, Surajit Das (Eds.), *DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors*, Springer, Singapore, 2018: pp. 61–74. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1583-1_4.
- [9] P. Gill, A. Urquhart, E. Millican, N. Oldroyd, S. Watson, R. Sparkes, C.P. Kimpton, A new method of STR interpretation using inferential logic - Development of a criminal intelligence database, *International Journal of Legal Medicine* 109 (1996) 14–22. <https://doi.org/10.1007/BF01369596>.
- [10] J.M. Butler, *Forensic DNA Typing: Methodology*, in: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, San Diego, 2012: pp. 213–270.
- [11] K.M. Sullivan, A. Mannucci, C.P. Kimpton, P. Gill, A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, *Biotechniques* 15 (1993) 636–640.
- [12] A. Urquhart, C.P. Kimpton, T.J. Downes, P. Gill, Variation in Short Tandem Repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers, *International Journal of Legal Medicine* 107 (1994) 13–20. <https://doi.org/10.1007/BF01247268>.
- [13] W. Bar, B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W. Mayr, B. Olaisen, DNA recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems, *International Journal of Legal Medicine* 110 (1997) 175–176. <https://doi.org/10.1007/s004140050061>.
- [14] C.M. Ruitberg, D.J. Reeder, J.M. Butler, STRBase: A short tandem repeat DNA database for the human identity testing community, *Nucleic Acids Research* 29 (2001) 320–322. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.320>.
- [15] M. Bodner, I. Bastisch, J.M. Butler, R. Fimmers, P. Gill, L. Gusmão, N. Morling, C. Phillips, M. Prinz, P.M. Schneider, W. Parson, Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on quality control of autosomal Short Tandem Repeat allele frequency databasing (STRidER), *Forensic Science International: Genetics* 24 (2016) 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.008>.
- [16] B. Budowle, T.R. Moretti, S.J. Niezgoda, B.L. Brown, CODIS and PCR-Based Short Tandem Repeat Loci: Law Enforcement Tools, in: *Second European Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, Innsbruck, Austria, 1998.
- [17] D.R. Hares, Expanding the CODIS core loci in the United States, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 52–54. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.012>.
- [18] D.R. Hares, Seleccion and implementation of expanded CODIS core loci in the United States, *Forensic Science International: Genetics* 17 (2015) 33–34. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.006>.
- [19] Council of the European Union, COUNCIL RESOLUTION of 25 June 2001 on the exchange of DNA analysis results, 2001/C 187/01 (2001). <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2001:187:0001:0004:EN:PDF>.
- [20] Council of the European Union, COUNCIL RESOLUTION of 30 November 2009 on the exchange of DNA analysis results, 2009/C 296/01 (2009). <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2009:296:0001:0003:EN:PDF>.
- [21] N.M.M. Novroski, F.R. Wendt, A.E. Woerner, M.M. Bus, M. Coble, B. Budowle, Expanding beyond the current core STR loci: An exploration of 73 STR markers with increased diversity for

- enhanced DNA mixture deconvolution, *Forensic Science International: Genetics* 38 (2019) 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.013>.
- [22] J.M. Butler, Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing, *BioTechniques* 43 (2018) 2–5. <https://doi.org/10.2144/000112582>.
- [23] M.D. Coble, J.M. Butler, Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Sci* 50 (2005).
- [24] J.J. Mulero, C.W. Chang, R.E. Lagacé, D.Y. Wang, J.L. Bas, T.P. McMahon, L.K. Hennessy, Development and validation of the AmpF ℓ STR ® MiniFiler ™ PCR amplification kit: A miniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA, *Journal of Forensic Sciences* 53 (2008) 838–852. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00760.x>.
- [25] M.J. Ludeman, C. Zhong, J.J. Mulero, R.E. Lagacé, L.K. Hennessy, M.L. Short, D.Y. Wang, Developmental validation of GlobalFiler ™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples, *International Journal of Legal Medicine* 132 (2018) 1555–1573. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1817-5>.
- [26] M.G. Ensenberger, K.A. Lenz, L.K. Matthies, G.M. Hadinoto, J.E. Schienman, A.J. Przech, M.W. Morganti, D.T. Renstrom, V.M. Baker, K.M. Gawrys, M. Hoogendoorn, C.R. Steffen, P. Martín, A. Alonso, H.R. Olson, C.J. Sprecher, D.R. Storts, Developmental validation of the PowerPlex ® Fusion 6C System, *Forensic Science International: Genetics* 21 (2016) 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.011>.
- [27] R. Tao, C. Chen, X. Sheng, R. Xia, X. Zhang, J. Zhang, Z. Yang, S. Zhang, C. Li, Validation of the Investigator 24plex QS Kit: a 6-dye multiplex PCR assay for forensic application in the Chinese Han population, *Forensic Sciences Research* (2019). <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1665160>.
- [28] S. Wang, F. Song, M. Xie, K. Zhang, B. Xie, Z. Huang, H. Luo, Evaluation of a six-dye multiplex composed of 27 markers for forensic analysis and databasing, *Molecular Genetics and Genomic Medicine* 8 (2020) e1419. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1419>.
- [29] K. Elwick, C. Mayes, S. Hughes-Stamm, Comparative sensitivity and inhibitor tolerance of GlobalFiler ® PCR Amplification and Investigator ® 24plex QS kits for challenging samples, *Legal Medicine* 32 (2018) 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.01.006>.
- [30] D. Zgonjanin, D. Nedić, R. Alghafri, S. Petković, R. Vukovićab, DNA typing from skeletal remains using GlobalFiler ™ PCR amplification and Investigator ® 24plex QS kits, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7 (2019) 50–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.021>.
- [31] Y.N. Oh, J.H. Park, S.B. Hong, K.J. Shin, Genetic analysis of old skeletal remains from Korean War victims using PowerPlex ® Fusion 6C and MiniSTR system for human identification, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 6 (2017) e192–e194. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.068>.
- [32] ThermoFisher Scientific, GlobalFiler ™ and GlobalFiler ™ IQC PCR Amplification Kits, User Guide (2019). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4477604.pdf>.
- [33] Promega Corporation, PowerPlex ® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems ® Genetic Analyzers, Technical Manual (2018). https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-fusion-6c-system-protocol.pdf?rev=a8d2566e44ca493db6da4c0256baee53&sc_lang=en.
- [34] QIAGEN, Investigator ® 24plex QS Handbook, Kit Handbooks (2021). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=debe09ab-5483-478b-aeb3-e5c128e78a92&lang=en>.
- [35] S. wah Lin, C. Li, S.C.Y. Ip, A selection guide for the new generation 6-dye DNA profiling systems, *Forensic Science International: Genetics* 30 (2017) 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.05.010>.
- [36] Promega Corporation, PowerPlex ® 35GY System for Use on the Spectrum CE System Technical Manual, (2023). <https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/powerplex-35gy-system-for-use-on-the-spectrum-ce-system-protocol.pdf?rev=73784550260947c3a6d308a6aaa21561&la=en>.
- [37] A. M'charek, V. Toom, L. Jong, The Trouble with Race in Forensic Identification, *Science, Technology, & Human Values* (2020). <https://doi.org/10.1177/0162243919899467>.
- [38] J.M. Butler, Lineage Markers: Y Chromosome and mtDNA Testing, in: *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Academic Press, San Diego, 2009: pp. 363–396.
- [39] L. Roewer, J. Amemann, N.K. Spurr, K.H. Grzeschik, J.T. Epplen, Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts, *Human Genetics* 89 (1992) 389–394. <https://doi.org/10.1007/BF00194309>.

- [40] L. Roewer, J.T. Epplen, Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work, *Forensic Science International* 53 (1992) 163–171. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90193-Z](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90193-Z).
- [41] M. Kayser, Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview, *Human Genetics* 136 (2017) 621–635. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1776-9>.
- [42] P. Gill, C. Brenner, B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, M.A. Jobling, P. De Knijff, M. Kayser, M. Krawczak, W.R. Mayr, N. Morling, B. Olaisen, V. Pascali, M. Prinz, L. Roewer, P.M. Schneider, A. Sajantila, C. Tyler-Smith, DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs, *Forensic Science International* 124 (2001) 5–10. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00498-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00498-4).
- [43] L. Gusmão, J.M. Butler, A. Carracedo, P. Gill, M. Kayser, W.R.R. Mayr, N. Morling, M. Prinz, L. Roewer, C. Tyler-Smith, P.M. Schneider, DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis, *Forensic Science International* 157 (2006) 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.04.002>.
- [44] J.L. Mulero, B. Budowle, J.M. Butler, L. Gusmão, Letter to the Editor—Nomenclature and Allele Repeat Structure Update for the Y-STR Locus GATA H4, *Journal of Forensic Sciences* 51 (2006) 694. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00149.x>.
- [45] J.M. Butler, Y -Chromosome DNA Testing, in: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, Waltham, 2012: pp. 371–403.
- [46] K.N. Ballantyne, M. Goedbloed, R. Fang, O. Schaap, O. Lao, A. Wollstein, Y. Choi, K. Van Duijn, M. Vermeulen, S. Brauer, R. Decorte, M. Poetsch, N. Von Wurmb-Schwark, P. De Knijff, D. Labuda, H. Vézina, H. Knoblauch, R. Lessig, L. Roewer, R. Ploski, T. Dobosz, L. Henke, J. Henke, M.R. Furtado, M. Kayser, Mutability of Y-chromosomal microsatellites: Rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications, *American Journal of Human Genetics* 87 (2010) 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.08.006>.
- [47] S. Willuweit, L. Roewer, Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update, *Forensic Science International: Genetics* 1 (2007) 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.017>.
- [48] C.R. Steffen, T.I. Huszar, L.A. Borsuk, P.M. Vallone, K.B. Gettings, A multi-dimensional evaluation of the ‘NIST 1032’ sample set across four forensic Y-STR multiplexes, *Forensic Science International: Genetics* 57 (2022) 102655. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102655>.
- [49] ThermoFisher Scientific, Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit, USER GUIDE (2019). https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4485610_YfilerPlus_UG.pdf.
- [50] Promega Corporation, PowerPlex® Y23 System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, TECHNICAL MANUAL (2021). https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-y23-system-protocol.pdf?rev=8436e307a2a0440b88b06b16254296c6&sc_lang=en.
- [51] QIAGEN, investigator® Argus Y-28 QS Handbook, Kit Handbook (2022). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=cf7ae42a-72bc-4d3d-812d-684d0625a179&lang=en>.
- [52] B. Ferreira-Silva, M. Fonseca-Cardoso, M.J. Porto, T. Magalhães, L. Cainé, A Comparison Among Three Multiplex Y-STR Profiling Kits for Sexual Assault Cases, *Journal of Forensic Sciences* 63 (2018) 1836–1840. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13757>.
- [53] S.F. Schaffner, The X chromosome in population genetics, *Nature Reviews Genetics* 5 (2004) 43–51. <https://doi.org/10.1038/nrg1247>.
- [54] I. Gomes, N. Pinto, S. Antão-Sousa, V. Gomes, L. Gusmão, A. Amorim, Twenty Years Later: A Comprehensive Review of the X Chromosome Use in Forensic Genetics, *Frontiers in Genetics* 11 (2020) 926. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00926>.
- [55] A. Edwards, A. Civitello, H.A. Hammond, C.T. Caskey, DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *American Journal of Human Genetics* 49 (1991) 746–756.
- [56] A.O. Tillmar, D. Kling, J.M. Butler, W. Parson, M. Prinz, P.M. Schneider, T. Egeland, L. Gusmão, DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis, *Forensic Science International: Genetics* 29 (2017) 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.05.005>.
- [57] R. Szibor, S. Hering, J. Edelmann, A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online, *International Journal of Legal Medicine* 2005 120:4 120 (2005) 252–254. <https://doi.org/10.1007/S00414-005-0029-Y>.

- [58] M. Scherer, M. König, M. Bussmann, A. Prochnow, R. Peist, Development and validation of the new Investigator® Argus X-12 QS Kit, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5 (2015) e256–e257.
- [59] QIAGEN, Investigator® Argus X-12 QS Handbook, Handbook (2015). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=d3ab4ec3-33ec-4be3-8a88-6b66ebebdcf0&lang=en>.
- [60] E. Tekeli, T. Gültekin, M.E. Doksanaltı, S.H. Öztaner, C. Elma, ACCURATE SEX DETERMINATION USING ANCIENT DNA ANALYSIS FOR HUMAN SKELETAL REMAINS FROM DIFFERENT HISTORICAL ARCHEOLOGICAL SITES IN TURKEY, *Mediterranean Archeology and Archaeometry* 20 (2020) 93–106. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3605672>.
- [61] M. Fondevila, R. Pereira, L. Gusmão, C. Phillips, M.V. Lareu, A. Carracedo, J.M. Butler, P.M. Vallone, Forensic performance of insertion-deletion marker systems, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3 (2011) e443–e444. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.09.083>.
- [62] M. Fondevila, C. Phillips, C. Santos, R. Pereira, L. Gusmão, A. Carracedo, J.M. Butler, M.V. Lareu, P.M. Vallone, Forensic performance of two insertion-deletion marker assays, *International Journal of Legal Medicine* 126 (2012) 725–737. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0721-7>.
- [63] QIAGEN, Investigator® DIPplex Handbook, (2014). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=97ae8219-edbf-495b-b6d5-a33b9df6a687&lang=en>.
- [64] M. Nunotani, T. Shiozaki, N. Sato, S. Kamei, K. Takatsu, T. Hayashi, M. Ota, H. Asamura, Analysis of 30 insertion-deletion polymorphisms in the Japanese population using the Investigator DIPplex® kit, *Legal Medicine* 17 (2015) 467–470. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.10.002>.
- [65] R. Klein, C. Neumann, R. Roy, Detection of insertion/deletion polymorphisms from challenged samples using the Investigator DIPplex® Kit, *Forensic Science International: Genetics* 16 (2015) 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.020>.
- [66] M. Saiz, A. Gutierrez-Carvajal, X. Galvez, J.A. Lorente, J.C. Alvarez, Population genetic data of 20 insertion-null allele markers in the Andalusian population, *International Journal of Legal Medicine* 133 (2019) 1397–1400. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02044-x>.
- [67] InnoGenomics, InnoTyper® 21 Human DNA Analysis Kit – User Guide v3.7, (2016). https://innogenomics.com/wp-content/uploads/2020/12/InnoTyper_21_User_Guide_V3.7.cleaned.pdf.
- [68] H. Brown, R. Thompson, G. Murphy, D. Peters, B. La Rue, J. King, A.H. Montgomery, M. Carroll, J. Baus, S. Sinha, F.R. Wendt, B. Song, R. Chakraborty, B. Budowle, S.K. Sinha, Development and validation of a novel multiplexed DNA analysis system, InnoTyper® 21, *Forensic Science International: Genetics* 29 (2017) 80–99. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.03.017>.
- [69] J. Bessetti, An Introduction to PCR Inhibitors, *Profiles in DNA* 10 (2007) 9–10.
- [70] R. Alaeddini, Forensic implications of PCR inhibition - A review, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>.
- [71] S. Kim, R.G. Labbe, S. Ryu, Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 1213–1215. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1213-1215.2000>.
- [72] J. Bickley, J.K. Short, D.G. McDowell, H.C. Parkes, Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions, *Letters in Applied Microbiology* 22 (1996) 153–158.
- [73] H. Nozawa, T. Yamamoto, R. Uchihi, T. Yoshimoto, K. Tamaki, S. Hayashi, T. Ozawa, Y. Katsumata, Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences, *Legal Medicine* 1 (1999) 61–67. [https://doi.org/10.1016/S1344-6223\(99\)80014-5](https://doi.org/10.1016/S1344-6223(99)80014-5).
- [74] K.L. Opel, D. Chung, B.R. McCord, A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR, *Journal of Forensic Sciences* 55 (2010) 25–33. <https://doi.org/10.1111/J.1556-4029.2009.01245.X>.
- [75] D. Sutlovic, S. Gamulin, M. Definis-Gojanovic, D. Gugic, S. Andjelinovic, Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics, *Electrophoresis* 29 (2008) 1467–1472.
- [76] C.D. Matheson, T.E. Marion, S. Hayter, N. Esau, R. Fratpietro, K.K. Vernon, Technical note: Removal of metal ion inhibition encountered during DNA extraction and amplification of copper-preserved archaeological bone using size exclusion chromatography, *American Journal of Physical Anthropology* 140 (2009) 384–391. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21106>.
- [77] D. Primorac, The role of DNA technology in identification of skeletal remains discovered in mass graves, *Forensic Science International* 146 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.049>.

- [78] S. Pääbo, Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 1939–1943.
- [79] L. Rossen, P. Nørskov, K. Holmstrøm, O.F. Rasmussen, Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, *International Journal of Food Microbiology* 17 (1992) 37–45. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90017-W](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90017-W).
- [80] C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne, C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne, PCR inhibitors - occurrence, properties and removal, *Journal of Applied Microbiology* 113 (2012) 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- [81] P. Rådström, R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lövenklev, C. Löfström, Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 26 (2004) 133–146. <https://doi.org/10.1385/MB:26:2:133>.
- [82] S. Oikarinen, S. Tauriainen, H. Viskari, O. Simell, M. Knip, S. Virtanen, H. Hyöty, PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants, *Journal of Clinical Virology* 44 (2009) 211–214. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.12.017>.
- [83] M.T. Bourke, C.A. Scherzinger, C. Ladd, H.C. Lee, NaOH Treatment to Neutralize Inhibitors of Taq Polymerase, *Journal of Forensic Sciences* 44 (1999) 12039J. <https://doi.org/10.1520/jfs12039j>.
- [84] A. Alonso, Š. Anđelinoviæ, P. Martín, D. Sutloviæ, I. Erceg, E. Huffine, L. Fernández de Simón, C. Albarrán, M. Definis-Gojanoviæ, A. Fernández-Rodríguez, P. García, I. Drmiæ, B. Rezić, S. Kuret, M. Sancho, D. Primorac, DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples, *Croatian Medical Journal* 42 (2001) 260–266.
- [85] M. Höss, S. Pääbo, DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 3913–3914.
- [86] QIAGEN, MinElute® Handbook, (2020). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=8f6b09b2-6dcd-4b55-bb4a-255ede40ca3b&lang=en>.
- [87] QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook, QIAquick PCR Purification Kit (2020). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en>.
- [88] B.M. Kemp, M. Winters, C. Monroe, J.L. Barta, How much DNA is lost? Measuring DNA loss of short-tandem-repeat length fragments targeted by the powerplex 16® system using the Qiagen Minelute purification kit, *Human Biology* 86 (2015) 313–329. <https://doi.org/10.13110/humanbiology.86.4.0313>.
- [89] H.Y. Lee, M.J. Park, N.Y. Kim, J.E. Sim, W.I. Yang, K.J. Shin, Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns, *Forensic Science International: Genetics* 4 (2010) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.014>.
- [90] Q. Hu, Y. Liu, S. Yi, D. Huang, A comparison of four methods for PCR inhibitor removal, *Forensic Science International: Genetics* 16 (2015) 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.001>.
- [91] J.K. Purzycka, I. Olewiecki, I. Soltyszewski, W. Pepinski, J. Janica, Efficiency comparison of seven different Taq polymerases used in hemogenetics, *International Congress Series* 1288 (2006) 719–721. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.09.073>.
- [92] M. Nilsson, J. Grånemo, M.M. Buš, M. Havsjö, M. Allen, Comparison of DNA polymerases for improved forensic analysis of challenging samples, *Forensic Science International: Genetics* 24 (2016) 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.017>.
- [93] N. Damaso, E.C. Ashe, K.A. Meiklejohn, M.F. Kavlick, J.M. Robertson, Comparison of polymerases used for amplification of mitochondrial DNA from challenging hairs and hairs of various treatments, *Forensic Science International: Genetics* 52 (2021) 102484. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102484>.
- [94] C. Monroe, C. Grier, B.M. Kemp, Evaluating the efficacy of various thermo-stable polymerases against co-extracted PCR inhibitors in ancient DNA samples, *Forensic Science International* 228 (2013) 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.02.029>.
- [95] J. Weusten, J. Herbergs, A stochastic model of the processes in PCR based amplification of STR DNA in forensic applications, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.003>.
- [96] P. Gill, J. Curran, K. Elliot, A graphical simulation model of the entire DNA process associated with the analysis of short tandem repeat loci, *Nucleic Acids Research* 33 (2005) 632–643. <https://doi.org/10.1093/nar/gki205>.
- [97] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories, 2017.

- [98] P.S. Walsh, H.A. Erlich, R. Higuchi, Preferential PCR Amplification of Alleles: Mechanisms and Solutions, *Genome Research* 1 (1992) 241–250. <https://doi.org/10.1101/gr.1.4.241>.
- [99] P. Gill, J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, J. Buckleton, An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Science International* 112 (2000) 17–40.
- [100] M. Harrel, D. Gangitano, S. Hughes-Stamm, The effects of extra PCR cycles when amplifying skeletal samples with the GlobalFiler® PCR Amplification Kit, *International Journal of Legal Medicine* 133 (2019) 745–750. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1860-2>.
- [101] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM Contamination Prevention and Detection Guidelines for Forensic DNA Laboratories, (2017). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_c4d4dbba84f1400a98eaa2e48f2bf291.pdf (accessed July 13, 2021).
- [102] A. Cooper, H. Poinar, Ancient DNA: Do It Right or Not at All, *Science* 289 (2000) 1139.
- [103] R.E. Green, A.W. Briggs, J. Krause, K. Prüfer, H.A. Burbano, M. Siebauer, M. Lachmann, S. Pääbo, The Neandertal genome and ancient DNA authenticity, *EMBO Journal* 28 (2009) 2494–2502. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.222>.
- [104] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic Analyses from Ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 645–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143214>.
- [105] Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, “Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación,” (1999). <https://www.ugr.es/~fjmartin/INFORMES/Criterios%20y%20estandares.pdf>.
- [106] Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul de la Junta de Andalucía, Caracterización media de las principales variables climáticas en Andalucía, (2022). https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/areas-tematicas/cambio-climatico-y-clima/clima-en-andalucia/caracterizacion_media_principales_variables_climaticas_andalucia.
- [107] D. Marjanović, A. Durmić-Pašić, N. Bakal, S. Haverić, B. Kalamujić, L. Kovačević, J. Ramić, N. Pojskić, V. Škaro, P. Projić, K. Bajrović, R. Hadžiselimović, K. Drobnič, E. Huffine, J. Davoren, D. Primorac, DNA Identification of Skeletal Remains from World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia *Forensic Science, Croatian Medical Journal* 48 (2007) 513–519.
- [108] S.W. Carlyle, R.L. Parr, M.G. Hayes, D.H. O’Rourke, Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest, *American Journal of Physical Anthropology* 113 (2000) 85–101.
- [109] M.N. Hochmeister, B. Budowle, Urs.V. Borer, U. Eggmann, C.T. Comey, R. Dirnhofer, Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains, *Journal of Forensic Sciences* 36 (1991) 1649–1661. <https://doi.org/10.1520/JFS13189J>.
- [110] Thermo Fisher Scientific, Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits, User Guide (2018). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf> (accessed July 29, 2021).
- [111] ThermoFisher Scientific, GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits, User Guide (2019). <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2F4477604.pdf>.
- [112] Promega Corporation, PowerPlex® Fusion 6C System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers, Technical Manual (2018).
- [113] QIAGEN, Investigator® 24plex QS Handbook, Kit Handbooks (2021). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=debe09ab-5483-478b-aeb3-e5c128e78a92&lang=en>.
- [114] B. Leclair, C.J. Frégeau, K.L. Bowen, R.M. Fourney, Systematic Analysis of Stutter Percentages and Allele Peak Height and Peak Area Ratios at Heterozygous STR Loci for Forensic Casework and Database Samples, *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 1–13. <https://doi.org/10.1520/JFS2003312>.
- [115] P. Gill, Ø. Bleka, A.E. Fonnelløp, Limitations of qPCR to estimate DNA quantity: An RFU method to facilitate inter-laboratory comparisons for activity level, and general applicability, *Forensic Science International: Genetics* 61 (2022) 102777. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102777>.
- [116] The jamovi project, jamovi (Version 2.2.5), (2021). <https://www.jamovi.org> (accessed July 5, 2022).
- [117] A.S. Holmes, R. Houston, K. Elwick, D. Gangitano, S. Hughes-Stamm, Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples, *Int J Legal Med* 132 (2018) 691–701. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1745-9>.
- [118] A.S. Holmes, R. Houston, K. Elwick, D. Gangitano, S. Hughes-Stamm, Comparison of four commercial qPCR kits for analyzing inhibited and degraded forensic samples, QIAGEN

- Application Note (2018). <https://annardx.com/wp-content/uploads/Comparison-of-4-commercial-qPCR-kits-for-analyzing-inhibited-and-degraded-forensic-samples.pdf>.
- [119] M. Harrel, C. Mayes, R. Houston, A.S. Holmes, R. Gutierrez, S. Hughes, The performance of quality controls in the Investigator® Quantiplex® Pro RGQ and Investigator® 24plex STR kits with a variety of forensic samples, *Forensic Science International: Genetics* 55 (2021) 102586. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102586>.
- [120] J.Y.Y. Tan, Y.P. Tan, S. Ng, A.S. Tay, Y.H. Phua, W.J. Tan, T.Y.R. Ong, L.M. Chua, C.K.C. Syn, A preliminary evaluation study of new generation multiplex STR kits comprising of the CODIS core loci and the European Standard Set loci, *Journal of Forensic and Legal Medicine* 52 (2017) 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.07.017>.
- [121] S. Lin, C. Li, S.C.Y. Ip, A selection guide for the new generation 6-dye DNA profiling systems, *Forensic Science International: Genetics* 30 (2017) 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.05.010>.
- [122] D. Zgonjanin, D. Nedić, R. Alghafri, S. Petković, R. Vukovićab, DNA typing from skeletal remains using GlobalFiler™ PCR amplification and Investigator® 24plex QS kits, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7 (2019) 50–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.021>.
- [123] S. Lin, C. Li, S.C.Y. Ip, A performance study on three qPCR quantification kits and their compatibilities with the 6-dye DNA profiling systems, *Forensic Science International: Genetics* 33 (2018) 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.016>.
- [124] O. Hansson, T. Egeland, P. Gill, Characterization of degradation and heterozygote balance by simulation of the forensic DNA analysis process, *Int J Legal Med* 131 (2017) 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1453-x>.
- [125] C.M. Cupples, J.R. Champagne, K.E. Lewis, T.D. Cruz, STR Profiles from DNA Samples with “Undetected” or Low Quantifiler™ Results, *Journal of Forensic Sciences* 54 (2009) 103–107. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00914.x>.
- [126] M. Poetsch, H. Konrad, J. Helmus, T. Bajanowski, N. von Wurmb-Schwark, Does zero really mean nothing?—first experiences with the new PowerQuant™ system in comparison to established real-time quantification kits, *Int J Legal Med* 130 (2016) 935–940. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1352-1>.
- [127] A. Doniec, M. Januła, P. Grzmił, T. Kupiec, Assessing the utility of quantitative and qualitative metrics in the DNA quantification process of skeletal remains for autosomal and Y-chromosome STR amplification purposes, *Forensic Science International: Genetics* 60 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102751>.
- [128] I. Zupanič Pajnič, T. Zupanc, J. Balažič, Ž.M. Geršak, O. Stojković, I. Skadrić, M. Črešnar, Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples, *Forensic Science International: Genetics* 27 (2017) 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.004>.
- [129] M.T.P. Gilbert, H.-J. Bandelt, M. Hofreiter, I. Barnes, Assessing ancient DNA studies, *Trends in Ecology & Evolution* 20 (2005) 541–544. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.005>.
- [130] E. Willerslev, A. Cooper, Ancient DNA, *Proc. R. Soc. B.* 272 (2005) 3–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>.
- [131] C. Haarkötter, X. Gálvez, D.C. Vinuesa-Espinosa, M.I. Medina-Lozano, M. Saiz, J.A. Lorente, J.C. Álvarez, A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains, *Forensic Science International* 348 (2023) 111730. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111730>.
- [132] D.G. Bonett, Confidence interval for a coefficient of quartile variation, *Computational Statistics & Data Analysis* 50 (2006) 2953–2957. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2005.05.007>.
- [133] QIAGEN, Investigator® Argus Y-28 QS Kit, Technical Information (2021). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=2f11ac23-d7e8-42cf-8be2-a8695a7e943c&lang=en>.
- [134] A.A. Westen, H. Haned, L.J.W. Grol, J. Harteveld, K.J. Van Der Gaag, P. De Knijff, T. Sijen, Combining results of forensic STR kits: HDplex validation including allelic association and linkage testing with NGM and Identifiler loci, *Int J Legal Med* 126 (2012) 781–789. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0724-4>.
- [135] D. Kling, A.O. Tillmar, T. Egeland, Familias 3 – Extensions and new functionality, *Forensic Science International: Genetics* 13 (2014) 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.004>.
- [136] GHEP-ISFG (Grupo de Habla Española y Portuguesa de la International Society for Forensic Genetics), Tabla de frecuencias españolas alélicas para STRs autosómicos/Autosomal STRs Spanish allele frequencies, (2022). https://ghep-isfg.org/usercontent/blobs/2022/03/01/YgsROqxbRNuAaeDU9WQhfg_frequencies_2022.pdf.

- [137] M. Van Den Berge, D. Wiskerke, R.R.R. Gerretsen, J. Tabak, T. Sijen, DNA and RNA profiling of excavated human remains with varying postmortem intervals, *Int J Legal Med* 130 (2016) 1471–1480. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1438-9>.
- [138] C. Martins, P.M. Ferreira, R. Carvalho, S.C. Costa, C. Farinha, L. Azevedo, António Amorim, M. Oliveira, Evaluation of InnoQuant® HY and InnoTyper® 21 kits in the DNA analysis of rootless hair samples, *Forensic Science International: Genetics* 39 (2019) 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.12.005>.
- [139] C. Martins, P.M. Ferreira, R. Carvalho, S.C. Costa, C. Farinha, L. Azevedo, A. Amorim, M. Oliveira, Internal validation of two new retrotransposons-based kits (InnoQuant® HY and InnoTyper® 21) at a forensic lab, *Forensic Science International* 283 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.11.037>.
- [140] H. Brown, G.P. Murphy, A.H. Montgomery, J. Tabak, S.K. Sinha, Developmental validation of InnoTyper® 21, a nuclear DNA typing system based on retrotransposable element polymorphisms for degraded forensic samples, *International Symposium on Human Identification (ISHI)* (2016). https://innogenomics.com/wp-content/uploads/2021/01/Innogenomics_ISHI_2016_IT21_Dev_Valid_Poster_Final.cleaned.pdf.
- [141] P.G. Ristow, N. Barnes, G.P. Murphy, H. Brown, K.W. Cloete, M.E. D’Amato, Evaluation of the InnoTyper® 21 genotyping kit in multi-ethnic populations, *Forensic Science International: Genetics* 30 (2017) 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.002>.
- [142] A. Amorim, A cautionary note on the evaluation of genetic evidence from uniparentally transmitted markers, *Forensic Science International: Genetics* 2 (2008) 376–378. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.04.001>.
- [143] B. Walsh, A.J. Redd, M.F. Hammer, Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers, *Forensic Science International* 174 (2008) 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.014>.
- [144] J. Buckleton, S. Myers, Combining autosomal and Y chromosome match probabilities using coalescent theory, *Forensic Science International: Genetics* 11 (2014) 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.009>.
- [145] Fondevila, M., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, A., Butler, J.M., Lareu, M.V., Vallone, P.M., An assessment of linkage between forensic markers: core STRs, mini-STRs and InDels, in: 2011. https://strbase-archive.nist.gov/pub_pres/ISHI2011_Fondevila.pdf.

10. Anexo I. Material suplementario del Experimento #4

	Muestra	GlobalFiler™				PowerPlex® Fusion 6C					Investigator® 24PLEX QS					
		>UA	>UE	RFU	PHR	REPORTABLE	>UA	>UE	RFU	PHR	REPORTABLE	>UA	>UE	RFU	PHR	REPORTABLE
1	Fémur	24	16	807	0,8	12	28	16	675	0,7	13	28	17	1166	0,8	12
2	Fémur	6	0	128	0,4	2	10	0	142		0	12	3	220	0,5	5
3	Fémur	33	15	974	0,8	18	31	17	1079	0,8	16	35	24	2198	0,7	18
4	Fémur	26	12	504	0,6	12	29	17	430	0,8	13	33	17	699	0,7	17
5	Petroso	37	32	8058	0,8	20	36	28	4982	0,8	19	36	31	7279	0,8	20
6	Petroso	33	26	7105	0,8	21	36	28	9857	0,7	22	33	33	11610	0,8	21
7	Petroso	18	9	1646	0,7	8	24	16	2038	0,7	11	28	16	3854	0,7	14
8	Petroso	34	23	6121	0,8	17	30	23	3701	0,8	14					
9	Petroso	36	27	6735	0,8	19	41	31	8771	0,7	22	36	29	8792	0,8	20
10	Petroso	32	23	5065	0,7	15	38	29	6475	0,8	19	36	27	7708	0,7	20
11	Petroso	29	18	4410	0,8	16	34	27	11789	0,7	19	33	28	9103	0,7	18
12	Petroso	36	28	7918	0,8	21	30	19	3061	0,8	17	33	31	8999	0,8	19
13	Petroso	28	22	8061	0,7	17	29	25	5112	0,7	17	33	28	9260	0,8	18
14	Petroso	30	18	4174	0,7	17	34	21	5451	0,7	18	36	29	8108	0,8	20
15	Petroso	37	44	9751	0,8	20	39	32	12391	0,8	20	28	26	8649	0,8	16
16	Fémur	28	19	1189	0,7	15	34	22	942	0,8	18	36	24	1609	0,7	20
17	Petroso	31	21	7313	0,8	17	35	26	8591	0,8	16	26	19	6120	0,6	15
18	Tibia	35	24	1259	0,7	19	25	12	605	0,7	12	34	20	1241	0,7	16
19	Petroso	26	19	6650	0,8	14	26	19	7379	0,8	14	27	19	8702	0,7	15
20	Petroso	32	22	5708	0,8	15	31	18	3518	0,7	15	28	20	7275	0,8	15
21	Petroso	31	20	6013	0,7	17	30	23	5560	0,8	15	26	19	7232	0,8	13
22	Petroso	1	0	74		0	2	0	64	0,7	0	2	0	112		0
23	Petroso	34	24	7975	0,8	17	35	24	9128	0,8	18	35	23	7908	0,8	17
24	Petroso	35	25	4946	0,7	17	31	21	6409	0,7	15	32	20	6864	0,7	17
25	Tibia	36	24	1385	0,7	18	33	21	1302	0,7	15	30	15	842	0,8	14
26	Tibia	24	8	561	0,8	12	20	9	604	0,7	10	18	10	706	0,7	9
27	Fémur	33	20	1134	0,6	17	33	19	803	0,7	15	35	19	1019	0,7	17
28	Tibia	22	9	479	0,7	10	26	7	376	0,6	11	23	10	505	0,7	9
29	Petroso	32	24	7927	0,7	16	32	26	6719	0,8	17	33	24	7768	0,7	17
30	Tibia	20	7	392	0,6	5	29	7	277	0,8	12	24	11	521	0,6	10
31	Petroso	27	21	6728	0,8	11	26	18	4460	0,7	13	27	19	7184	0,6	13
32	Tibia	16	2	201	0,5	6	12	0	154	0,7	3	4	1	333		1
33	Diente	37	34	2280	0,8	20	41	29	1503	0,7	22	39	30	2731	0,7	21
34	Petroso	35	13	655	0,7	16	39	16	498	0,8	19					
35	Tibia	19	6	297	0,6	8	19	4	344	0,7	7	16	9	422	0,6	7
36	Diente	37	35	5492	0,8	21	40	33	3572	0,8	22	37	37	6008	0,8	21
37	Tibia	18	5	231	0,7	8	19	1	203	0,6	8	26	8	259	0,7	10
38	Petroso	35	23	6361	0,8	16	35	24	6777	0,7	16	37	23	6097	0,7	18
39	Tibia	29	4	276	0,6	4	26	2	164	0,8	8	21	4	247	0,8	7
40	Diente	34	12	551	0,7	17	32	14	434	0,7	14					
41	Petroso	28	21	6550	0,8	16	37	29	9428	0,8	20					
42	Tibia	39	39	8690	0,9	21	42	39	4782	0,8	23	39	38	8911	0,8	21
43	Fémur	34	25	2382	0,8	18	39	31	2281	0,8	21	35	33	5095	0,9	21

Capítulo 4. Amplificación de ADN

44	Fémur	16	5	281	0,5	6	23	7	254	0,7	9	29	11	415	0,7	13
45	Fémur	26	6	364	0,8	12	30	14	366	0,8	13	35	17	782	0,8	15
46	Fémur	35	23	1161	0,7	17	38	24	1184	0,8	20	37	32	2119	0,8	20
47	Fémur	28	15	899	0,7	12	34	22	1123	0,7	15	34	21	1736	0,7	18
48	Fémur	27	12	900	0,7	13	26	14	710	0,7	12	29	16	1942	0,7	15
49	Diente	35	14	638	0,7	17	26	9	311	0,7	11					
50	Petroso	24	16	4090	0,7	11	25	16	2829	0,7	12	1	0	166		0
51	Diente	39	26	1607	0,6	15	35	13	475	0,5	16	37	19	1220	0,7	18
52	Petroso	37	20	2877	0,7	16	30	10	818	0,6	15	41	22	2757	0,7	21
53	Petroso	25	20	6776	0,8	12	25	16	1943	0,8	12	30	21	9169	0,8	14
54	Petroso	21	9	1278	0,7	6	17	5	304	0,8	8	31	11	1826	0,7	13
55	Petroso	25	18	5802	0,8	11	23	15	3936	0,7	12	21	15	7846	0,7	11
56	Petroso	28	18	4538	0,7	14	20	16	1636	0,7	9	25	18	6046	0,7	13
57	Petroso	22	15	4545	0,7	12	26	19	4463	0,7	13	29	17	5279	0,8	15
58	Petroso	32	22	4447	0,7	18	32	21	4241	0,8	15					
59	Petroso	22	15	2644	0,7	12	23	15	1521	0,8	12	25	19	5454	0,7	13
60	Petroso	22	15	3553	0,8	12	31	16	3355	0,7	17	29	17	4399	0,6	14
61	Petroso	30	23	5829	0,7	16	32	23	6051	0,8	17	28	20	7135	0,7	14
62	Petroso	30	18	3933	0,7	16	28	21	3736	0,7	13	31	20	5528	0,7	15

11. Anexo II. Material suplementario del Experimento #5

	Muestra	Quantifiler™ Trio			Yfiler™ Plus				PowerPlex® Y23				Argus Y-28				GlobalFiler™			
		QTRIO Peq	QTRIO Gran	QTRIO Y	>UA	RFU	PHR	LOCI	>UA	RFU	PHR	LOCI	>UA	RFU	PHR	LOCI	>UA	>ST	RFU	LOCI
1	Tibia	0,056	0,021	0,065	21	409	0,7	19	23	1392	0,5	22	25	662	0,8	24	16	4	443	7
2	Fémur	0,002	0,001	0,001	2	96		2	2	83		2	0	0		0	4	1	254	1
3	Fémur	0,102	0,058	0,095	26	1436	1,0	25	23	3187	0,7	22	27	1386	0,9	26	34	32	1016	19
4	Cúbito	0,001	0,001	0,001	0	66		0	4	105		4	0	67		0	0	0	0	0
5	Fémur	0,212	0,071	0,161	27	1142	0,8	25	23	4807	1,0	22	27	1871	0,8	26	38	36	1819	20
6	Tibia	0,027	0,005	0,025	5	128		5	19	420	0,7	18	18	271	1,0	17	23	12	663	12
7	Fémur	0,002	0,001	0,002	2	87		2	10	166	0,5	9	2	86		2	5	1	240	1
8	Tibia	0,159	0,024	0,181	27	1362	0,8	25	23	3161	0,7	22	27	2040	0,8	26	25	16	810	14
9	Fémur	0,008	0,005	0,004	13	154		12	13	219	0,8	12	9	110	0,8	9	34	20	530	19
10	Fémur	0,001		0,001	0	68		0	1	74		1	0	0		0	0	0	0	0
11	Fémur	0,050	0,006	0,032	18	256	0,8	16	22	552	0,6	21	22	370	0,9	21	30	24	1139	17
12	Fémur	0,006	0,003	0,003	13	126	0,7	12	17	264	1,0	16	13	146		13	9	0	258	2
13	Fémur	0,005	0,002	0,002	8	108		8	16	282		15	7	142		7	16	4	290	7
14	Fémur	0,001	0,000	0,001	0	52		0	3	138		3	1	71		1	1	0	305	0
15	Diente	0,041	0,009	0,034	23	544	0,6	22	21	1059	0,5	20	21	462	0,5	20	36	25	885	19
16	Diente	0,008	0,004	0,010	12	226	0,7	11	14	320	0,3	13	9	148		8	32	14	432	14
17	Diente	0,022	0,010	0,025	23	385	0,9	21	22	831	0,5	21	21	403	0,3	20	38	34	1190	20
18	Diente	0,005	0,001	0,006	9	154		8	12	241		12	8	135		7	28	4	206	10
19	Diente	0,058	0,012	0,042	19	554	1,0	17	19	641	0,6	18	18	322	0,8	17	37	28	1527	19
20	Diente	0,004	0,000	0,002	0	77		0	6	115		6	3	96		3	16	0	105	5
21	Diente	0,015	0,001	0,009	6	127		6	9	213		9	5	113	0,9	5	23	6	236	10
22	Diente	0,001	0,001		0	0		0	2	91		2	0	73		0	15	0	130	3
23	Diente	0,014	0,002	0,011	9	175		9	9	278	0,8	8	7	142		7	36	23	1039	19
24	Diente	0,009	0,001	0,008	3	107		3	9	190	0,6	8	5	108		4	15	4	265	7
25	Diente	0,006	0,001	0,006	4	150		4	3	179		3	3	112		3	20	0	146	8
26	Diente	0,024	0,003	0,030	16	444	0,9	15	15	961	0,7	14	15	430	0,8	14	27	12	781	14
27	Diente	0,003	0,001	0,002	2	95		2	8	122	0,6	7	1	90		1	21	3	149	7
28	Diente	0,007	0,001	0,007	13	200	0,8	12	14	455	0,5	13	11	214		10	28	5	203	13
29	Diente	0,014	0,002	0,008	7	158	0,9	7	14	366	0,5	13	10	202		9	35	13	344	16
30	Diente	0,064	0,009	0,055	21	683	0,9	19	18	1596	0,7	17	21	710	0,9	20	37	25	1447	20
31	Diente	0,031	0,006	0,031	19	590	0,7	18	14	1177	0,7	13	17	409	0,6	16	35	20	1107	19
32	Diente	0,032	0,008	0,025	20	669		19	18	1190		18	19	695		19	36	23	1039	19
33	Fémur	0,009	0,002	0,015	19	360	0,6	18	17	573	0,9	16	14	250	0,8	13	36	15	572	19
34	Fémur	0,019	0,001	0,024	9	232		9	10	464	0,7	9	8	175	0,8	7	17	8	650	7
35	Fémur	0,101	0,015	0,116	21	599	0,9	19	18	1839	0,7	17	19	954	0,8	18	38	21	1385	19
36	Fémur	0,039	0,004	0,045	7	231		7	11	787	0,8	10	12	400	0,8	11	26	11	694	12
37	Fémur	0,012	0,001	0,017	1	99		1	7	202	0,8	6	4	138		4	18	2	182	7
38	Fémur	0,014	0,002	0,019	4	127		4	11	372	0,4	10	7	206		7	18	7	384	7
39	Fémur	0,030	0,002	0,042	9	311		9	13	614	0,7	12	12	445	0,9	11	27	11	752	13
40	Diente	0,004	0,001	0,005	8	130		8	9	238	0,6	8	0	72		0	25	6	245	10
41	Diente	0,004	0,002	0,004	7	112		7	10	196		9	0	66		0	36	7	195	18
42	Diente	0,009	0,002	0,006	11	141		11	14	297	0,8	13	0	0	0	0	29	7	296	13
43	Diente	0,034	0,008	0,028	23	658	0,7	22	21	1076	1,0	20	21	664	0,8	20	37	24	1088	20

Capítulo 4. Amplificación de ADN

44	Diente	0,055	0,016	0,047	25	1022	0,6	23	20	2235	0,6	19	23	908	0,8	22	41	35	2285	20
45	Diente	0,002	0,001	0,002	6	95		6	6	161		6	0	71		0	19	3	201	4
46	Diente	0,014	0,000	0,012	4	189		4	7	317		7	7	225		6	17	4	255	7
47	Diente	0,010	0,001	0,009	10	278		9	11	419	1,0	10	7	186		7	28	8	374	11
48	Diente	0,013	0,001	0,012	8	220	1,0	8	13	397	0,6	12	6	176		6	29	10	346	12
49	Diente	0,002	0,000	0,002	0	52		0	3	119		3	1	95		1	7	0	122	2
50	Diente	0,030	0,004	0,036	7	301		7	13	1110	0,9	12	14	610	0,9	13	31	12	788	16
51	Diente	0,030	0,003	0,026	16	695	0,8	15	14	1104	0,6	13	18	612	0,6	17	29	15	812	13
52	Fémur	0,083	0,007	0,081	12	281		12	15	692	0,7	14	10	335	1,0	9	26	10	741	11
53	Fémur	0,042	0,004	0,038	6	196		6	12	735	0,7	11	10	230	0,6	9	22	7	508	9
54	Fémur	0,058	0,004	0,057	5	212		5	14	774	0,8	13	12	380	0,4	11	23	11	544	10
55	Tibia	0,037	0,002	0,038	11	339	1,0	11	13	1275	0,4	12	12	408	0,4	11	34	17	987	18
56	Tibia	0,008	0,001	0,013	8	170	0,7	8	11	199	0,4	10	4	120	1,0	4	19	4	268	9
57	Tibia	0,011	0,002	0,016	11	152	0,9	10	13	276	0,7	12	6	172	0,5	5	28	13	494	13
58	Tibia	0,049	0,001	0,050	8	249		8	14	773	0,8	13	11	411	0,8	10	23	15	1559	9
59	Fémur	0,057	0,012	0,046	16	202	0,4	15	21	1576	0,9	20	16	428	0,7	15	40	36	2466	21
60	Tibia	0,047	0,004	0,057	10	211	0,6	10	15	1403	0,7	14	15	607	0,7	14	36	24	1475	19
61	Cúbito	0,023	0,003	0,027	2	83		2	12	642		12	10	309	0,7	9	39	19	705	20
62	Tibia	0,034	0,003	0,044	16	396	1,0	15	12	885		12	10	398	0,7	9	26	18	1264	13
63	Tibia	0,013	0,002	0,017	5	169		5	14	631		14	11	252		10	31	8	476	15

12. Anexo III. Material suplementario del Experimento #6

	Type	QTrio Small	QTrio Large	QTrio Y	GF Alleles	GF RFU	GF PHR	GF Loci	GF 1/RMP	IT21 Alleles	IT21 RFU	IT21 Loci	IT21 PHR	IT21 1/RMP
1	Diente	0,003	0,001	0,001	11	142	0,5	1	2,25E+02	18	194	6	0,6	4,55E+01
2	Diente	0,069	0,057	0,073	11	1469	0,6	4	2,09E+05	32	5297	16	0,8	1,68E+06
3	Húmero	0,000	0,000	0,000	2	72	0,0	0	1,00E+00	3	130	1	0,0	2,09E+00
4	Tibia	0,000	0,000	0,000	1	52	0,0	0	1,00E+00	2	169	0	0,0	1,00E+00
5	Fémur	0,005	0,001	0,000	2	217	0,0	0	1,00E+00	9	182	3	0,0	8,67E+00
6	Fémur	0,004	0,000	0,000	22	163	0,7	5	2,06E+06	18	241	6	0,8	4,01E+02
7	Fémur	0,005	0,001	0,000	1	373	0,0	1	3,22E+01	16	254	6	0,5	1,08E+03
8	Fémur	0,006	0,003	0,000	19	136	0,5	2	2,02E+03	22	216	11	0,8	1,69E+05
9	Fémur	0,005	0,000	0,000	2	203	0,0	0	1,00E+00	18	208	3	0,5	1,11E+01
10	Fémur	0,004	0,000	0,002	0	0	0,0	0	1,00E+00	17	165	1	0,5	2,07E+00
11	Fémur	0,007	0,001	0,007	3	453	0,0	1	3,22E+01	23	244	11	0,7	4,31E+05
12	Fémur	0,009	0,001	0,000	11	285	0,8	4	1,54E+04	19	332	13	0,8	2,18E+05
13	Fémur	0,001	0,000	0,000	7	71	0,8	2	2,43E+02	12	218	8	0,0	3,73E+03
14	Fémur	0,004	0,000	0,000	13	194	0,6	3	5,73E+00	25	251	13	0,8	8,66E+05
15	Fémur	0,007	0,001	0,008	8	124	1,0	1	1,72E+01	21	336	11	0,6	7,48E+05
16	Fémur	0,009	0,001	0,000	17	151	0,6	4	1,65E+05	32	526	9	0,4	1,88E+03
17	Fémur	0,014	0,002	0,001	19	255	0,8	5	8,88E+07	33	583	13	0,7	6,49E+04
18	Fémur	0,002	0,000	0,000	4	81	0,0	0	1,00E+00	10	137	1	0,7	2,13E+00
19	Fémur	0,000	0,000	0,000	19	327	0,7	6	1,38E+07	31	1537	16	0,8	7,62E+06
20	Fémur	0,004	0,000	0,000	2	81	0,0	0	1,00E+00	7	135	0	0,6	3,50E+00
21	Fémur	0,007	0,001	0,003	15	180	0,6	2	1,18E+02	29	467	10	0,5	4,19E+03
22	Fémur	0,000	0,000	0,000	4	150	0,0	0	1,00E+00	18	267	8	0,6	7,22E+03
23	Fémur	0,000	0,000	0,000	4	103	0,0	0	1,00E+00	6	143	1	0,0	3,50E+00
24	Fémur	0,002	0,000	0,001	2	69	0,0	0	1,00E+00	3	106	0	0,0	1,00E+00
25	Fémur	0,028	0,010	0,018	17	165	0,7	5	3,86E+06	13	208	6	0,0	7,60E+02
26	Fémur	0,161	0,056	0,136	12	172	0,7	3	1,63E+04	26	532	14	0,6	1,71E+07
27	Tibia	0,206	0,086	0,151	4	114	0,6	1	6,20E+02	9	136	1	0,0	3,07E+00
28	Húmero	0,002	0,000	0,002	1	52	0,0	0	1,00E+00	11	165	3	0,7	6,42E+00
29	Húmero	0,003	0,001	0,007	15	157	0,6	1	3,18E+01	19	291	6	0,6	2,51E+02
30	Húmero	0,003	0,000	0,000	12	130	0,7	2	1,16E+02	23	267	10	0,7	1,89E+04
31	Fémur	0,009	0,001	0,000	17	216	0,6	4	7,18E+04	29	702	13	0,5	1,49E+06
32	Fémur	0,007	0,001	0,004	26	154	0,6	5	1,69E+06	26	268	6	0,6	5,67E+02
33	Fémur	0,010	0,001	0,012	14	343	0,8	5	1,04E+05	30	747	16	0,7	2,99E+06
34	Fémur	0,022	0,004	0,031	29	768	0,7	11	3,60E+22	32	3489	14	0,7	5,93E+05
35	Tibia	0,028	0,004	0,000	32	574	0,5	8	2,97E+09	31	2079	14	0,6	2,23E+06
36	Fémur	0,049	0,009	0,064	37	755	0,8	14	2,45E+32	29	5407	17	0,7	1,87E+08
37	Fémur	0,006	0,001	0,005	20	267	0,5	3	1,27E+03	30	439	13	0,6	3,89E+06
38	Fémur	0,006	0,000	0,000	12	216	0,7	5	1,39E+03	26	552	18	0,7	8,08E+07
39	Tibia	0,006	0,000	0,007	6	130	0,0	0	1,00E+00	25	381	7	0,4	1,60E+03
40	Fémur	0,005	0,000	0,000	12	257	0,7	5	8,47E+04	30	565	13	0,7	2,71E+05
41	Fémur	0,001	0,000	0,001	4	73	0,7	2	1,61E+01	14	230	9	0,0	3,58E+04
42	Fémur	0,007	0,000	0,000	18	222	0,7	4	3,64E+05	31	819	10	0,6	7,26E+05
43	Fémur	0,005	0,001	0,005	22	223	0,7	6	2,75E+07	27	739	16	0,7	3,76E+07
44	Fémur	0,010	0,001	0,000	19	378	0,7	6	1,27E+06	31	846	13	0,6	1,47E+05

Capítulo 4. Amplificación de ADN

45	Fémur	0,006	0,001	0,000	13	240	0,6	4	1,00E+04	25	432	14	0,6	9,25E+05
46	Fémur	0,004	0,000	0,004	19	377	0,7	9	7,83E+10	28	353	14	0,7	9,43E+04
47	Fémur	0,003	0,000	0,002	8	113	0,7	1	1,99E+01	15	191	8	0,7	1,13E+03
48	Fémur	0,002	0,000	0,001	6	174	0,6	0	1,00E+00	5	146	2	0,0	1,77E+01
49	Fémur	0,000	0,000	0,000	1	69	0,0	0	1,00E+00	3	146	1	0,0	1,95E+00
50	Fémur	0,008	0,001	0,005	14	140	0,7	5	1,30E+06	29	822	15	0,7	3,89E+07
51	Cúbito	0,001	0,000	0,000	3	63	0,0	0	1,00E+00	12	165	4	0,0	6,96E+02
52	Fémur	0,023	0,001	0,001	11	106	0,8	3	2,84E+02	24	384	11	0,5	5,93E+06
53	Húmero	0,001	0,000	0,000	0	0	0,0	0	1,00E+00	2	151	0	0,0	1,00E+00
54	Húmero	0,001	0,000	0,001	0	0	0,0	0	1,00E+00	10	211	3	0,0	1,89E+01
55	Cúbito	0,004		0,004	10	108	0,6	2	1,04E+02	17	293	8	0,8	3,59E+03
56	Húmero	0,004		0,003	5	155	0,5	0	1,00E+00	12	210	4	0,6	4,23E+01
57	Húmero	0,000	0,000	0,000	0	0	0,0	0	1,00E+00	4	123	0	0,0	1,00E+00
58	Húmero	0,003	0,001	0,000	24	153	0,4	1	2,00E+01	15	153	3	0,5	1,01E+02
59	Fémur	0,001	0,000	0,000	3	62	0,0	0	1,00E+00	2	116	0	0,0	1,00E+00
60	Tibia	0,001	0,000	0,001	0	0	0,0	0	1,00E+00	1	90	0	0,0	1,00E+00
61	Tibia	0,024	0,000	0,025	27	463	0,6	7	1,17E+10	27	833	15	0,6	1,33E+06
62	Tibia	0,010	0,001	0,006	23	254	0,7	7	9,29E+11	28	506	17	0,8	4,18E+05
63	Fémur	0,001	0,001	0,002	6	85	0,9	1	7,69E+01	19	154	2	0,6	7,54E+00
64	Diente	0,003	0,000	0,002	10	167	0,9	3	6,70E+02	28	257	13	0,7	1,79E+05
65	Diente	0,006	0,002	0,005	28	251	0,7	10	3,74E+13	31	580	11	0,6	5,73E+05
66	Diente	0,005	0,001	0,006	13	268	0,5	3	1,73E+02	34	442	14	0,8	3,22E+05
67	Diente	0,002	0,001	0,004	25	163	0,6	4	3,39E+04	28	338	14	0,6	5,10E+05
68	Diente	0,004	0,001	0,002	22	158	0,6	6	5,77E+07	31	331	8	0,5	5,45E+03
69	Diente	0,005	0,001	0,004	15	99	0,7	6	7,92E+08	31	478	13	0,6	1,46E+06
70	Diente	0,007	0,001	0,000	10	100	0,9	2	4,19E+02	29	581	13	0,6	6,54E+04

Capítulo 5. Secuenciación de ADN



La ausencia de restos de pólvora en sus manos no significa nada, aunque su presencia podría decirlo todo.

Sherlock Holmes, Los monigotes saltarines.



Resumen: El desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN ha permitido conocer, nucleótido a nucleótido, la composición del material genético del ser humano. Este capítulo tiene el objetivo de revisar las técnicas de secuenciación y su aplicación en la identificación humana, desde la tradicional secuenciación por el método de Sanger hasta las más modernas plataformas de secuenciación masiva. Finalmente, se hace un experimento para probar la aplicabilidad de las técnicas de secuenciación utilizadas en los estudios de ADN antiguo (aDNA) en el ámbito forense, viéndose que, si bien no constituyen una solución definitiva para el problema de las muestras críticas, constituyen una poderosa fuente de información, así como una herramienta de la que obtener nuevas perspectivas en el análisis de este tipo de muestras.

Palabras clave: 1240k; ADN antiguo; ADN mitocondrial; NGS; SNPs

Abstract: The development of DNA sequencing techniques has allowed for the determination, nucleotide by nucleotide, of the human genetic material. This chapter aims to review sequencing techniques and their application in human identification, ranging from traditional Sanger sequencing to the more modern platforms of massive sequencing. Finally, an experiment is conducted to test the applicability of sequencing techniques used in ancient DNA (aDNA) studies in the forensic field. It is observed that while these techniques do not constitute a definitive solution for critical samples, they serve as a powerful source of information and a tool for gaining new perspectives in the analysis of such samples.

Keywords: 1240k; Ancient DNA; Mitochondrial DNA; NGS; SNPs

1. Introducción

Hasta ahora hemos visto el enorme poder que tiene la tecnología del análisis de ADN mediante STRs; sin embargo, hay ocasiones en las que las muestras están tan degradadas o la misma es tan mínima que no se obtienen resultados mediante un análisis forense de ADN convencional, o los mismos resultan insuficientes. En otras situaciones puede ocurrir que sea necesario obtener más información de las muestras más allá de la meramente identificativa, como el origen geográfico, la ancestralidad, o incluso características fenotípicas como el color de los ojos. El presente capítulo se centra en el uso forense de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y del análisis de ADN mitocondrial, así como en las tecnologías de secuenciación de nueva generación.

2. Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)

Si bien por una parte tenemos en el ADN variaciones en longitud (repeticiones cortas en tándem o STRs), encontramos también en el genoma humano variaciones, no ya en el número de repeticiones, sino en la secuencia concreta de nucleótidos: sustituciones, inserciones o deleciones en la misma posición, polimorfismos que se denominan de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) [1]. En la **Figura 1** puede verse un esquema de los mismos comparados con los STRs, y en la **Tabla 1** sus diferencias.

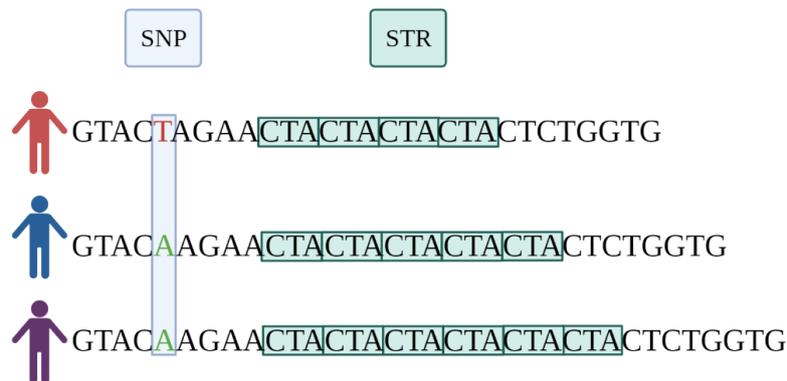


Figura 1. Diagrama de los polimorfismos de tipo SNP y STR. Editado con Biorender

Con respecto a su nomenclatura, normalmente los SNPs se nombran con las siglas rs (Reference SNP) seguida de un número asignado por la base de datos NCBI en función del orden en que ese polimorfismo haya sido reportado [2], como, por ejemplo, el SNP rs1490413. En este sentido es la base de datos de SNPs del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) una de las más utilizadas, ofreciendo de cada SNP la posición que ocupa, los alelos, la frecuencia por poblaciones, y las publicaciones en las que se ha citado. Otra fuente de datos de frecuencias alélicas para SNPs es ALFRED (The ALlele FREquency Database), que contiene más de 660 000 polimorfismos de más de 760 poblaciones, todos ellos con sus respectivas frecuencias alélicas [3], e incluso hay disponibles herramientas específicas para el cálculo del LR como es el caso de FROG-kb [4].

Tabla 1. Diferencias entre STRs y SNPs [5]

Característica	STRs	SNPs
Frecuencia	Aproximadamente 1 cada 15.000 pares de bases	Aproximadamente 1 cada 1000 pares de bases
Información	Alta	Baja
Tasa de mutación	Aproximadamente 1 en 1000	Aproximadamente 1 en 100.000.000
Tipo de marcador	Repeticiones de 2, 3, 4, ó 5 nucleótidos con diversos alelos	Bialélicos con 6 posibilidades: A/G, C/T, A/T, C/G, T/G, A/C
Alelos por marcador	De 5 a 20	2 (en algunos casos 3)
Método de detección	Electroforesis capilar	Electroforesis capilar Secuenciación masiva
Multiplexación	Sí	Sí
Tamaño del amplicón	75-400 pares de bases	Menos de 100 pares de bases
Predicción de características	Limitada	Ancestralidad Fenotípicas

2.1. Tipos de SNPs.

Los SNPs aplicados al ámbito forense no se pueden discutir de manera genética, habida cuenta de que existen multitud de aplicaciones especializadas, como los análisis de linajes por ADN mitocondrial o cromosoma Y, el análisis de muestras muy degradadas de ADN, análisis de ancestralidad, identificación masiva de muestras o determinación de características físicas; es por ello que se habla de SNPs de identificación, SNPs de linaje, SNPs de ancestralidad, y SNPs fenotípicos [6].

2.1.1. SNPs de identificación

Son cuatro las características de los SNPs que permiten plantear su uso en identificación humana: una tasa de mutación recurrente (que ocurre entre generaciones con cierta frecuencia) de prácticamente cero, naturaleza dialélica, tamaño pequeño de amplicón, y son fácilmente multiplexables; sin embargo, la obtención de un panel de SNPs de identificación válido para diferentes poblaciones es un trabajo titánico: uno de los primeros estudios analizó 90 000 SNPs en poblaciones europeas, americanas, afroamericanas y china/japonesas, quedando 14 638 con una heterocigosidad adecuada, de los cuales sólo 195 estaban lo suficientemente separados unos de otros, que fueron probados en siete poblaciones reduciéndose a 35, que volvieron a ser probados en otras cuarenta poblaciones, reduciéndose a un total de 19 [7]. En la *Tabla 2* pueden verse los diferentes paneles de SNPs de identificación.

Tabla 2. Paneles de SNPs de identificación [8,9]

Set	Número de marcadores	Referencia
KiddLab-45 Unlinked IISNPs	45	[10,11]
KiddLab – List of 86 IISNPs	86	[11]
KiddLab – Interim Panel of 40 IISNPs	40	[12]
SNPforID 52-plex	52	[13]
Qiagen Investigator DIPplex kit	30	[14]
Panel of 25 IISNPs	25	[15]
Dixon’s 21-plex assay (Foren-SNP multiplex kit)	21	[16]
Pereira’s 38 indelplex for II	39	[17]
Vallone’s set of 70 SNPs (Orchid SNPs)	70	[18]
CODIS Set	13	[19]

Actualmente el Precision ID Identity Panel de ThermoFisher [20] contiene 90 SNPs de dos paneles diferentes [12,21], mientras que el ForenSeq DNA Signature Prep Kit de Verogen [22] contiene 94 SNPs igualmente obtenidos de dos paneles [7,13].

2.1.2. SNPs de linaje.

Teniendo en cuenta la ausencia de recombinación del ADN mitocondrial y del cromosoma Y, se empezaron a resolver casos criminales sin cerrar, así como de personas desaparecidas por aproximaciones de genealogía forense, que utilizan datos de SNPs en combinación con bases de datos para encontrar parientes de los donantes anónimos de indicios biológicos [23]. En este sentido se han identificado 59 SNPs en el ADN mitocondrial que permiten discriminar hacer discriminaciones dentro de los propios haplogrupos [24], pero la tendencia en esta línea es hacer estudios de alta densidad de SNPs, desarrollándose recientemente un panel de 5422 marcadores que combinan SNPs de identificación, ancestralidad, fenotípicos y de los cromosomas sexuales denominado FORCE (Forensic Capture Enrichment) [25]. En esta vía Verogen ha desarrollado el kit ForenSeq Kintelligence Kit, que contiene 9867 SNPs de este tipo [26], y aproximaciones como esta han mostrado su utilidad para la identificación de restos óseos degradados [27].

En relación con estos SNPs están los microhaplotipos, marcadores de menos de 300 nucleótidos y que consisten en las diferentes combinaciones de dos o más SNPs relacionados, teniendo como ventaja la ausencia de stutters, pero con una herencia en bloque y una tasa de mutación menor a los STRs, siendo por tanto útiles para estudios de identificación y de ancestralidad [28].

2.1.3. SNPs de ancestralidad.

La identificación humana subyace en la segregación de alelos polimórficos en los diferentes individuos dando combinaciones únicas; sin embargo, la estructura genética del ser humano moderno ha desembocado en la distribución desigual de estos alelos en las diferentes poblaciones

[29], dando lugar a las diferentes investigaciones sobre marcadores informativos de ancestralidad o SNPs de ancestralidad. En la **Tabla 3** se muestran los principales paneles disponibles.

Tabla 3. Paneles de SNPs de ancestralidad [8,9]

Set	Número de marcadores	Población diana	Referencia
Seldin's list of 128 AISNPs	128	América	[30,31]
SNPforID 34-plex	34	Global	[32]
Revised SNPforID 34-plex	34	Global	[33]
KiddLab - Set of 55 AISNPs	55	Global	[34,35]
Kayser's set of 24 Ancestry Informative Markers	24	Estados Unidos	[36]
Daniele Podini's list of 32 AISNPs	32	Estados Unidos	[37]
Eurasiaplex 23 SNP Panel	23	Europa Sur de Asia	[38,39]
Nievergelt's Set of 41AIMs	41	Global	[40]
Overlap set of AISNPs	44	Global	[41]
Li's panel of 27 AISNPs	27	África Europa Este de Asia	[42]
Li's panel of 74 AIMS	74	Este de Asia	[43]
Combined panel of Kiddlab-55,Seldin's-128, and SNPforID34-plex AISNPs (192 SNPs)	192	Global	[30,32,34,35]
SWA 86 AISNP panel	86	Sur de Asia	[44]
Pacifiplex	29	Australia Pacífico	[45]
EUROFORGEN Global ancestry-informative SNP panel	126	Africana Europea Este de Asia Nativos americanos Oceanía	[46,47]
Precision ID Ancestry Panel	165	Global	[31,34,38]
46-plex Indels	46	Global	[48]
Bulbul's 32plex (22 AIMS + 10 PI markers)	22	Global	[38]
Peristera's panel of 50 SNPs	50	Global	[49]
Rogalla's set of 14 AINPs	14	Europea Este de Asia África	[50]

Los kits comerciales actuales manejan un panel de 93 SNPs para poblaciones de Oceanía, Sur de Asia, Este de Asia, África Subsahariana, América del Sur y del Norte y Europa, llegando a distinguir incluso subpoblaciones como la árabe, askenazi, o los pigmeos [30]. En combinación con este se utiliza también un panel específicamente diseñado para uso forense compuesto por 55 SNPs analizados en más de setenta poblaciones diferentes, contemplando incluso el cálculo de una razón de verosimilitud (LR) con un software específico [34].

Los resultados tanto de SNPs de ancestralidad como de SNPs fenotípicos se consiguen mediante el análisis estadístico de grupos, una técnica que consiste en ordenar los datos disponibles en grupos de acuerdo a unos criterios determinados, como la distancia de los datos entre sí, un análisis no supervisado en el que se infieren grupos significativos o clasificaciones (*clusters*), utilizando métodos derivados de los esotéricos conocidos *data mining*, *machine learning*, y la inferencia estadística [51], generando dendogramas o mapas de calor en la que se representa la probabilidad asignada a cada grupo. Emplean esta técnica programas informáticos como STRUCTURE [52].

2.1.4. SNPs fenotípicos.

Normalmente en Ciencia Forense se trabaja con un método comparativo en el que se cotejan muestras dubitadas con muestras indubitadas. Sin embargo, hay escenarios en los que podría resultar de utilidad para la resolución del caso la obtención de características físicas de la víctima o del sospechoso, es decir, la predicción de características fenotípicas a partir de las características genotípicas del donante de la muestra, como son el color de los ojos, la pigmentación del pelo y de la piel, la calvicie, o la morfología del cabello [53]. En la *Tabla 4* pueden verse los principales paneles de SNPs fenotípicos.

Tabla 4. Paneles de SNPs fenotípicos [8,9]

Nombre	Número de marcadores	Características fenotípicas predichas	Referencia
Bulbul's 32plex	10	Ojos Piel Pelo	[38]
Kayser's 43 SNPs for Hair Color Prediction	43	Pelo	[54]
Kayser's 6-plex for eye color prediction - IrisPlex	6	Ojos	[55]
Ruiz's 23 SNPs for eye color prediction	23	Ojos	[56]

Junto con los diferentes paneles se ha desarrollado una herramienta bioinformática para la predicción de las características fenotípicas de color del pelo, pigmentación de la piel, y color y forma del pelo en base a 41 SNPs: HIrisPlex-S [57]. En relación a esta línea de estudio destaca el Consorcio VISAGE (*VISible Attributes Through GENomics*), creado en 2017 para el desarrollo y la validación de herramientas basadas en tecnologías de secuenciación masiva para la predicción de características como la apariencia o la edad basada en evidencias de ADN localizadas en el lugar de los hechos [58].

2.2. Técnicas de análisis de SNPs.

Hay multitud de estrategias para el análisis de SNPs basadas en diferentes tecnologías: sondas Taqman (detección basada en PCR a tiempo real), Acycloprime-FP (basado en la fluorescencia de nucleótidos incorporados a la reacción), GoldenGate (que utiliza nanopartículas), iPlex Gold (que emplea como detector un espectrómetro de masas), y el que se ha instaurado como uno de los más utilizados, los microarrays de ADN [59] (más popularmente conocidos como chips, que veremos más adelante a propósito de la secuenciación masiva).

Snap shot™ de Applied Biosystems es un ensayo en solución (no en un chip) simple y robusto que no utiliza material distinto al disponible en un laboratorio de Genética Forense, en el que un cebador de extensión del SNP hibrida con el amplicón desnaturalizado (previa amplificación purificada con exonucleasas), extendiéndose el primer con uno de los cuatro posibles ddNTPs marcados con un fluorocromo, observándose posteriormente el cebador extendido con el didesoxinucleótido se observa mediante electroforesis capilar, identificándose los diferentes SNPs en un multiplex por sus diferencias de movilidad, ya sea porque a los cebadores se les incorpora una cola de polinucleótidos, ya porque se incorporan modificadores de la movilidad a los extremos 5' de los mismos [60] (véase la **Figura 2**).

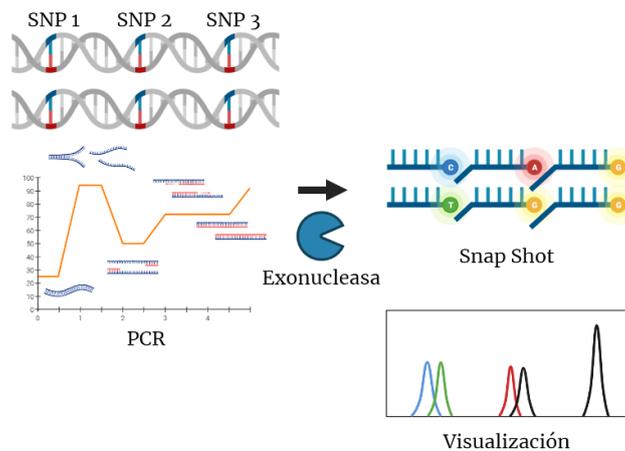


Figura 2. Esquema del análisis de SNPs mediante Snapshot. Editado con Biorender

Esta tecnología se ha probado en huesos de entre 200 y 500 años, consiguiendo perfiles en la mayoría de las muestras cuando los STRs y miniSTRs habían fallado, observándose además menos artefactos relacionados con los efectos estocásticos que con la tecnología de repeticiones en tándem [61]. Otro estudio señala una mejora de un 10% en el número de identificaciones, aunque también apunta a problemas como los resultados negativos, *dropouts*, y discordancias entre ensayos que tuvieron que ser comprobadas con Sanger [62].

3. Análisis de ADN mitocondrial

Habitualmente cuando se habla de ADN se piensa en el contenido en el núcleo celular, sin embargo, existen unos orgánulos de doble membrana en los que se desarrolla la fosforilación oxidativa y que también contienen ADN: las mitocondrias. Los orígenes de las mitocondrias se sitúan hace 1450 millones de años, cuando un organismo unicelular (procariota o eucariota según la vertiente teórica concreta) entró en simbiosis con una bacteria aerobia obligatoria [63], quedando su ADN como una suerte de reliquia de tal unión. En cualquier caso, el ADN mitocondrial presenta una serie de características que lo hacen especialmente interesante para el análisis forense, como pasamos a desarrollar a continuación.

3.1. Estructura del ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial es una molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 16.569 pares de bases, cadenas con diferente riqueza de bases púricas y pirimidínicas, lo que permite diferenciarlas en una cadena ligera (rica en bases pirimidínicas) y una cadena pesada (rica en bases púricas), con genes para 2 ARNs ribosómicos, 14 ARNs de transferencia, 12 polipéptidos y 13 proteínas para el sistema de fosforilación oxidativa [64], como se muestra en la **Figura 3**.

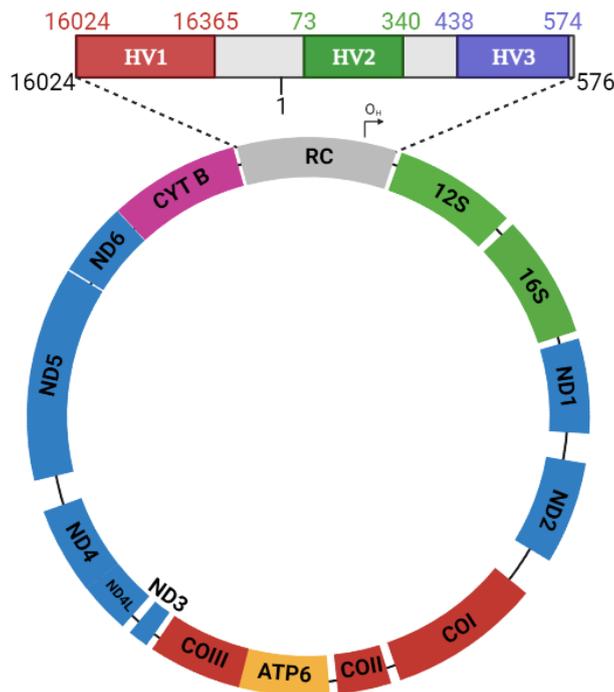


Figura 3. Esquema del ADN mitocondrial. Editado con Biorender

Entre las regiones codificantes se encuentra una región no codificante que constituye la denominada región control, también llamada asa de desdoblamiento o *D-Loop* por sus estructuras durante la replicación [65]. Esta contiene unas regiones altamente polimórficas conocidas como regiones hipervariables (HV), como son HV1 (16024-16365), HV2 (73-340) y HV3 (438-574) [66].

El ADN mitocondrial se secuenció por primera vez en Cambridge en 1981, obteniéndose una secuencia de referencia que pasó a denominar CRS, *Cambridge Reference Sequence* [67], que fue ligeramente modificada casi dos décadas más tarde, desembocando en la rCRS, *revised Cambridge Reference Sequence* [68].

Se ha criticado el uso de la rCRS por dos motivos: la confusión de las mutaciones ancestrales y derivadas, y el hecho de que, por las características del ADN que se secuenció, aparezcan en los estudios siempre las mismas mutaciones, por lo que se propuso un *giro copernicano* y se propuso una secuencia reconstruida del sapiens o RCRS (*Reconstructed Sapiens Reference Sequence*) [69]. Sin embargo, la utilización de una secuencia de referencia “ancestral” empeoraría las comunicaciones científicas y llevaría a problemas de interpretación en las comunidades médica y forense, y es que la secuencia de referencia de Cambridge tiene una amplia trayectoria que implicaría una revisión de innumerables protocolos y bases de datos [70].

3.2. Características del ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial presenta tres características que lo hacen particularmente interesante para su análisis en el campo forense. La primera de ellas es su elevado número de copias [71], lo que permite el análisis de muestras mínimas como restos óseos o pelos sin raíz.

Con respecto a la proporción ADN nuclear/ADN mitocondrial esta parece que varía en función del tipo de hueso, con una proporción menor en el petroso que en dientes u otros huesos. Este dato también se puede tomar como un indicador de la presencia de ADN endógeno: la ratio nuclear/mitocondrial es más alta ante la presencia de ADN exógeno, y es que parece ser que en restos óseos antiguos el ADN mitocondrial se conserva mejor que el nuclear, debido quizás a la doble membrana de la mitocondria, a la mejor descomposición de este material genético, o a las diferencias metabólicas entre los huesos cuando formaban al sujeto vivo [72]. Incluso dentro del mismo hueso pueden encontrarse diferencias: el ADN mitocondrial parece perdurar mejor en la dentina que en el cemento de las piezas dentales, debido a la presencia de fibras nerviosas ricas en mitocondrias en la dentina [73].

La segunda es su transmisión exclusivamente por línea materna en bloque, sin recombinación [74], una característica muy útil en identificación humana teniendo en cuenta que permite la comparación directa de secuencias de ADN de individuos relacionados por vía materna sin las ambigüedades en la interpretación propias de la meiosis.

Finalmente, el ADN mitocondrial presenta una alta tasa de mutación, de unas 0,02 sustituciones por cada millón de años, lo que probablemente se deba a su estructura y a la escasa presencia de mecanismos de reparación, condición que hace de esta molécula de una extrema utilidad para estudios de evolución humana y ancestralidad [75].

Sin embargo, presenta una serie de desventajas en comparación con el análisis de los marcadores de ADN nuclear. Una de ellas es su organización compacta, dando más de un 90% de ADN codificante [67], por lo que es muy poco polimórfico, quedando pequeños segmentos de interés forense, como es el caso de la región control. Otra desventaja es su mayor susceptibilidad a la degradación, motivada por la ausencia de organización (como es el caso del ADN nuclear con la cromatina) [76]. La herencia exclusivamente materna y en bloque supone a su vez una desventaja, no permitiendo la discriminación entre individuos por vía materna. Además, la ausencia de recombinación implica que los cálculos estadísticos van a estar determinados por el tamaño de la base de datos que se utilice, de la misma manera que sucedía con el análisis de STRs del cromosoma Y.

Otra característica del ADN mitocondrial a considerar son las heteroplasmias, la presencia de más de un genotipo de mtDNA en un individuo debido a un evento de mutación que, dependiendo de si se ha producido en la línea germinal o en los tejidos somáticos (por lo que puede observarse a nivel de mitocondria, de célula, o de tejidos), puede encontrarse en un único tejido o en varios, siendo lo más frecuente la mutación en una única base, siendo las heteroplasmias en dos o más bases un evento más raro [77]. A nivel analítico encontramos heteroplasmias de secuencia (dos bases diferentes en la misma posición) y de longitud (variación en el número de bases en un mismo fragmento, frecuente en las regiones de policitosinas de HV1 (16189T) y HV2 (303-315) [78].

3.3. Aplicaciones del análisis de ADN mitocondrial

Teniendo en cuenta las características del mtDNA, son tres sus principales aplicaciones [79]: investigación biológica de la maternidad, pues permite la determinación de relaciones biológicas por línea materna, teniendo en cuenta que este material genético se hereda en bloque de madres a hijos; Criminalística, dado el alto número de copias de este ADN presente en cada célula permite el estudio de muestras antiguas y/o muy degradadas en los que el tipado mediante STRs no haya tenido éxito; y estudios poblacionales, pues teniendo en cuenta por un lado su forma de transmisión, y por otro el ritmo de mutación que presenta, se puede clasificar a los seres humanos en diferentes haplogrupos (**Figura 4**).

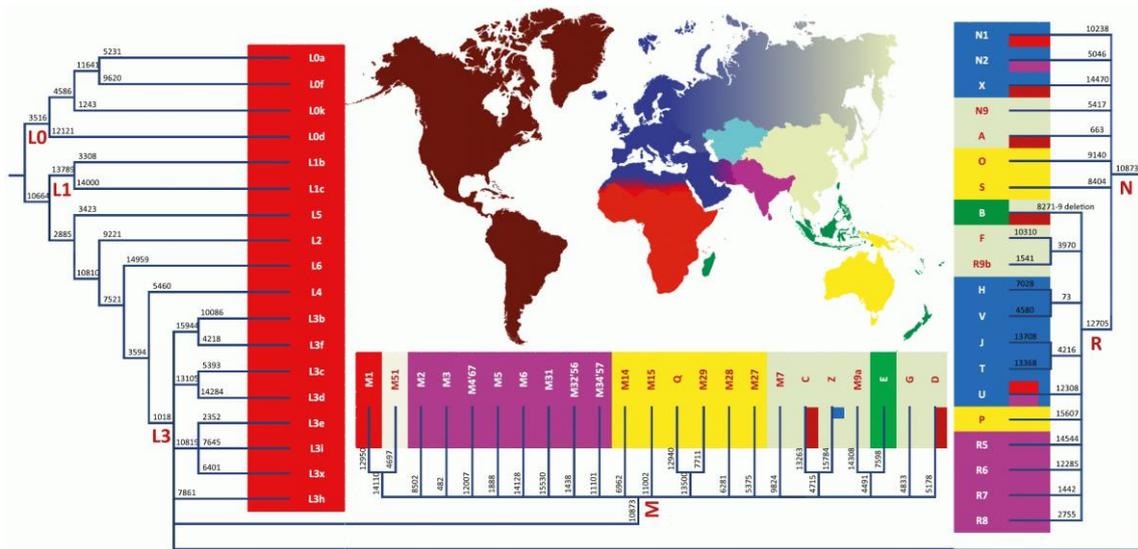


Figura 4. Haplogrupos de ADN mitocondrial [80]

3.4. Procedimiento analítico del ADN mitocondrial

El análisis de ADN mitocondrial es de los más costosos, tanto en tiempo como económicamente, por la multitud de etapas y procesos que comprende, como se muestra en la **Figura 5**. Teniendo en cuenta que el flujo analítico es el mismo para todas las muestras independientemente del análisis que vaya a hacerse hasta la cuantificación, examinaremos los siguientes puntos, dejando la visualización de resultados para el siguiente capítulo.

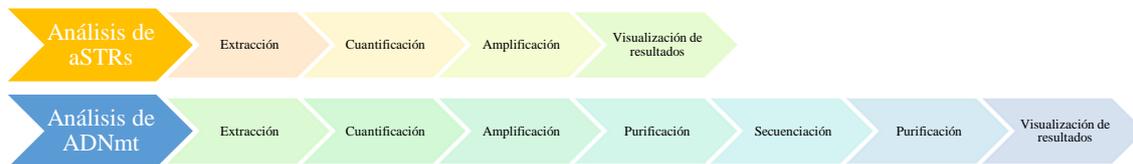


Figura 5. Esquema de los procedimientos analíticos de STRs autosómicos y ADN mitocondrial.

3.4.1. Amplificación de ADN mitocondrial

A diferencia del análisis de STRs, para la amplificación de ADN mitocondrial no hay kits comerciales disponibles, sino que los primers a utilizar van a depender del criterio del investigador, que se ayudará del estado de la muestra, de los datos de cuantificación, y de análisis previos para establecer la mejor estrategia de amplificación. De esta manera, si la muestra está en buenas condiciones puede abogarse por amplificar de una vez la región control completa, o si por el contrario se prevé un mal estado del ADN, se puede optar por fragmentos solapantes de menor tamaño [81]. En la **Tabla 5** pueden verse las diferentes estrategias y sus parejas de primers correspondientes, y en la **Figura 6** un mapa de los amplicones.

Tabla 5. Estrategias de amplificación de ADN mitocondrial

Estrategia	Primers	Amplificación (pb)	
Región control completa [66]	HV	L15971 - H408	1006
	HV1	L15996 (A1) - H16401 (B1)	405
	HV2	L29 (C1) - H389 (D1)	360
Secuencias de Primers FBI [82]	HV1A	L15997 - H16395	437
	HV1B	L15997 - H17	629
	HV2A	L48 - H408	401
	HV2B	L16555 - H619	612
	HV3	L350 - H619	310
Primer Set [83]	PS1	F15989/R16251 F15971/R16258	263 288
	PS2	F16190/R16410-M19 F16190/R16400	221 211
	PS3	F15/R285 F15/R270 F29/R270 F29/R274	271 256 242 246
	PS4	F140/R389 F155/R389 F155/R381 F155/R484	250 235 227 330
	PS5	F16363/R16	233
	MiniPrimer Set [83]	MPS1A	F15989/R16158
MPS1B		F16112/R16251 F16112/R16237	140 126
MPS2A		F16190/R16322	133
MPS2B		F16222/R16410-M19 F16268/R16410-M19 F16222/R16400 F16268/R16400	189 143 179 133
MPS3A		F34/R159	126
MPS3B		F109/R240	132
MPS4A		F151/R292	142
MPS4B		F220/R389	170
MPS5A		F16363/R16509	147
Secuencias de los primers			
F15971	5'-TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC-3'		
F15989	5'-CCC AAA GCT AAG ATT CTA AT-3'		
L15997	5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3'		
F16112	5'-CAC CAT GAA TAT TGT ACG GT-3'		
F16190	5'-CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT-3'		
F16222	5'-CCT CAA CTA TCA CAC ATC-3'		
F16268	5'-CAC TAG GAT ACC AAC AAA CC-3'		
F16363	5'-CCC CAT GGA TGA CCC CCC-3'		

F16450	5'-GCT CCG GGC CCA TAA CAC TTG-3'
R16158	5'-TAC TAC AGG TGG TCA AGT AT-3'
R16237	5'-TGT GTG ATA GTT GAG GGT TG-3'
R16251	5'-GGA GTT GCA GTT GAT GT-3'
R16258	5'-TGG CTT TGG AGT TGC AGT TG-3'
R16322	5'-TGG CTT TAT GTA CTA TGT AC-3'
H16395	5'-CAC GGA GGA TGG TGG TCA AG-3'
R16400	5'-GTC AAG GGA CCC CTA TCT GA-3'
H16401	5'-TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG-3'
R16410-M19	5'-GAG GAT GGT GGT CAA GGG A-3'
R16509	5'-AGG AAC CAG ATG TCG GAT AC-3'
L16555	5'-CCC ACA CGT TCC CCT TAA AT-3'
F15	5'-CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG-3'
R16	5'-TGA TAG ACC TGT GAT CCA TCG TGA-3'
H17	5'-CCC GTG AGT GGT TAA TAG GGT-3'
F29	5'-CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC-3'
F34	5'-GGG AGC TCT CCA TGC ATT TGG TA-3'
L48	5'-CTC ACG GGA GCT CTC CAT GC-3'
F109	5'-GCA CCC TAT GTC GCA GTA TCT GTC-3'
F140	5'-CCT GCC TCA TCC TAT TAT TTA-3'
F151	5'-CTA TTA TTT ATC GCA CCT-3'
F155	5'-TAT TTA TCG CAC CTA CGT TC-3'
R159	5'-AAA TAA TAG GAT GAG GCA GGA ATC-3'
F220	5'-TGC TTG TAG GAC ATA ATA AT-3'
R240	5'-TAT TAT TAT GTC CTA CAA GCA-3'
R270	5'-TGG AAA GTG GCT GTG CAG AC-3'
R274	5'-TGT GTG GAA AGT GGC TGT GC-3'
R285	5'-GTT ATG ATG TCT GTG TGG AA-3'
R292	5'-ATT TTT TGT TAT GAT GTC T-3'
L350	5'-GCA CTT AAA CAC ATC TCT GCC A-3'
R381	5'-GCT GGT GTT AGG GTT CTT TG-3'
H389	5'-CTG GTT AGG CTG GTG TTA GG-3'
F403	5'-TCT TTT GGC GGT ATG CAC TTT-3'
H408	5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3'
R484	5'-TGA GAT TAG TAG TAT GGG AG-3'
R569	5'-GGT GTG TTT GGG GTT TGG TTG-3'
R599	5'-TTG AGG AGG TAA GCT ACA TA-3'
H619	5'-GGT GAT GTG AGC CCG TCT AA-3'

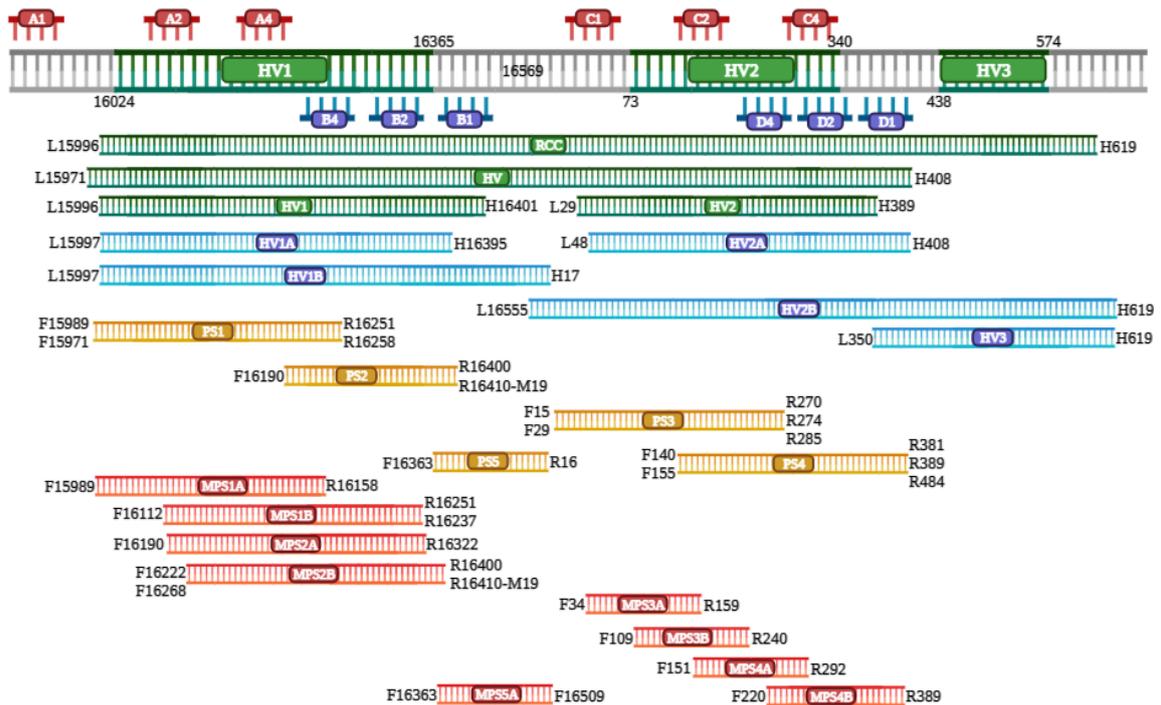


Figura 6. Esquema de las estrategias de amplificación de ADN mitocondrial. Editado con Biorender

Otro aspecto a considerar en esta etapa es la eficiencia de la ADN polimerasa, pues un estudio realizado con diferentes polimerasas en muestras de pelo sin raíz determinó que las polimerasas KAPA HiFi HotStart (Roche) y PrimeSTAR® HS (Takara Bio) rinden mejor que la validad AmpliTaq Gold de ThermoFisher [84]. A esta misma conclusión llegó un estudio años antes realizado en resto óseos [85].

3.4.2. Purificación de la amplificación

Una vez se ha comprobado que la amplificación ha sido exitosa (mediante la aplicación de alguno de los métodos de cuantificación ya vistos, como por ejemplo el gel de agarosa al 2%, o un espectrofotómetro) se procede a la eliminación de componentes de la amplificación que no han reaccionado y que pueden interferir negativamente en pasos posteriores, como son los primers y nucleótidos no incorporados en la reacción de PCR. Para ello hay disponibles diversas estrategias, siendo las columnas de QIAGEN QIAquick [86] y MinElute [87], y la exonucleasa de ThermoFisher ExoSAP-IT™ Express [88] de los más utilizados. Comparativamente ambos recuperan aproximadamente la misma cantidad de amplicón (75% las columnas frente al 78% del ExoSAP-IT), sin embargo el uso de esta exonucleasa gana en eficacia al ser mucho menos laborioso [89]. Un método basado en columnas y que promete un 80-95% de recuperación del amplificado es MSB® Spin PCRapace (INVITEK Molecular), un protocolo que destaca por su rapidez, consiguiéndose la purificación en 7 minutos [90].

3.4.3. Secuenciación

El siguiente paso es la reacción de secuenciación, siendo el método de Sanger [91] el más utilizado. Este consiste en la adición en el pocillo de reacción de la muestra del amplicón y, además de los componentes habituales de una amplificación, un único primer, nucleótidos, y didesoxinucleótidos (ddNTPs), que son nucleótidos con una reducción del grupo hidroxilo del carbono 3', lo que impide que se unan más nucleótidos al polímero que esté formando la ADN polimerasa. De esta manera, la ADN polimerasa va a generar fragmentos en cada ciclo fragmentos de 1,2,3...n nucleótidos (**Figura 7**).

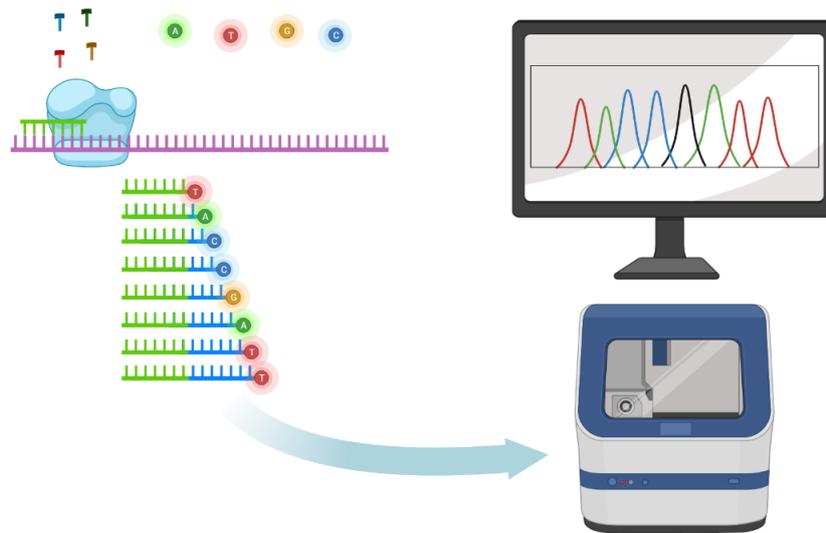


Figura 7. Secuenciación por el método de Sanger. Editado con Biorender

Hay disponibles diversos kits de secuenciación. Por un lado, están los kits BigDye™ Terminator v1.1 y v3.1 de ThermoFisher, ambos aplicados con éxito en restos óseos [92,93]. La diferencia entre ambos kits radica fundamentalmente en el tamaño del amplicón: si se van a secuenciar fragmentos pequeños interesa que se pierda la mínima información posible cerca del primer, siendo el kit v1.1 el idóneo para esta tarea; si en cambio los amplicones a secuenciar son más grandes, esa precisión se puede sacrificar a cambio de secuenciar un producto de mayor tamaño, siendo el kit v3.1 el mejor a utilizar [94]. Así, BigDye™ Terminator v1.1 está recomendado para secuenciar amplicones de hasta 500 pares de bases, de manera que para secuenciar fragmentos más grandes se recomienda recurrir al kit v3.1 [95].

Como alternativa está disponible la química del kit ProDye™ Terminator Sequencing System de Promega [96], compatible con todo tipo de muestras, y que todavía no ha sido probado en restos óseos o muestras forenses debido a su reciente lanzamiento.

3.4.4. Purificación de la secuenciación

Después de la reacción de secuenciación es necesario realizar una última purificación de los terminadores que no se han incorporado a la misma, y es que podrían interferir en la posterior

visualización de resultados. Tradicionalmente se venían utilizando las columnas de Centri-Sep™ de Applied Biosystems, actualmente descatalogadas. Hoy día hay diferentes soluciones disponibles, como el kit BigDye XTerminator™ de ThermoFisher, cuyo funcionamiento se fundamenta en una resina que elimina los terminadores no incorporados a la reacción de secuenciación, y otra que estabiliza los productos de secuenciación [97]. Otros kits permiten trabajar en columna o en placa, como es el caso de las Optima™ DTR de EdgeBio, fundamentadas igualmente en una resina [98]. Así, se ha señalado el XTerminator™ como el preferido para la purificación por reducir el tiempo por muestra, así como el número de artefactos observados en el electroferograma, mejorando en definitiva el análisis de ADN mitocondrial [99].

Con respecto a ambas purificaciones (posterior a la amplificación y posterior a la amplificación), se ha establecido la combinación de ExoSAP-IT™ y XTerminator™ en sus respectivos pasos como el *gold standard* del análisis de ADN mitocondrial [99,100].

La última etapa la constituye la visualización de resultados y edición del electroferograma mediante electroforesis capilar, aspecto que será analizado en el siguiente capítulo.

4. Secuenciación de nueva generación

La secuenciación por Sanger es una técnica con un enorme potencial, pero también es laboriosa y costosa, con poca capacidad para trabajar con un número elevado de muestras al mismo tiempo. Es por ello que se han venido desarrollando nuevas técnicas de secuenciación, dando lugar a lo conocido actualmente como secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS) y la secuenciación masiva en paralelo (*massively parallel sequencing*, MPS).

La revolución que supone la NGS radica en la posibilidad de hacer no una, sino cientos o miles de secuenciacines simultáneas de una misma muestra, además de la posibilidad de secuenciar en un mismo ensayo diversas partes del genoma (o incluso el genoma completo), partiendo de cantidades muy pequeñas de ADN, abaratando el esfuerzo económico y de mano de obra que supondría alcanzar los mismos resultados por el método de Sanger, si bien la inversión inicial que el laboratorio tiene que hacer para implementar esta técnica es considerable, además de la ingente cantidad de datos que se generan con estos ensayos [101].

Generalmente, un ensayo de NGS, independientemente de la plataforma utilizada, tiene aproximadamente las mismas etapas: a partir de un extracto de ADN, se amplifican las regiones de interés mediante PCR, a los amplicones se unen adaptadores, constituyéndose así la denominada librería, que se cuantifica para a continuación realizar la reacción de secuenciación sobre un chip o celda, para finalmente alinear las secuencias obtenidas con una secuencia de referencia [102]. Algunos conceptos básicos a la hora de hablar de NGS son [103]:

- Adaptadores (*adapters*). Oligonucleótidos de secuencia conocida que se unen a los fragmentos de ADN que se van a secuenciar.
- Código de barras (*barcodes*). Secuencias cortas de nucleótidos que identifican las muestras para su posterior unión en un mismo chip o celda.
- Enriquecimiento o captura (*target enrichment/capture*). Métodos que permiten aislar y obtener múltiples copias de regiones de interés del ADN antes de la secuenciación.
- Lectura (*read*). Información de las pares de bases de un fragmento de ADN de la librería que se ha secuenciado. Puede ser única (*single*, expresado como 1 x n bp) o pareada (*paired*, expresada como 2 x n bp), en función de si se secuencian los extremos 5' de una o dos cadenas complementarias.
- Librería (*library*). Colección de fragmentos de ADN con adaptadores unidos para su secuenciación.
- Panel. Conjunto de regiones de interés del ADN que pueden ser capturadas y enriquecidas.
- Profundidad de cobertura (*depth of coverage*). Número de lecturas de una región de interés del ADN que se ha secuenciado, normalmente expresada como nx.
- Profundidad de secuenciación (*sequencing depth*). Número de reacciones de secuenciación requeridas para alcanzar una cierta profundidad de lectura, expresada en millones de lecturas o número de megabases o gigabases.

También es importante destacar la técnica de la PCR en emulsión, probablemente la más utilizada para la generación de librerías. La misma consiste en la amplificación de moléculas de ADN en picolitros de volumen, en un medio acuoso inmerso a su vez en gotas de aceite, con el objetivo de evitar la formación de artefactos entre fragmentos de ADN con información similar [104].

4.1. Métodos de secuenciación

A la hora de hablar de las plataformas de NGS se vienen expresando como diferentes generaciones. Así, la primera generación la conforma la secuenciación por Sanger, la segunda generación las plataformas de secuenciación por pirosecuenciación, por síntesis, por ligación o por detección de protones; la tercera generación las técnicas de secuenciación de una única molécula de ADN o célula, y la cuarta y actualmente última generación la de nanoporos [105].

En la pirosecuenciación, la utilizada por los sistemas Roche 454 System (**Figura 8**), en lugar de utilizar didesoxinucleótidos para terminar la cadena, de lo que se trata es de detectar el pirofosfato que se libera durante la incorporación de un nucleótido al polímero de secuenciación. En el caso del equipo de Roche, las librerías se desnaturalizan en ADN monocatenario y se capturan con nanopartículas, realizándose a continuación una PCR en emulsión. Posteriormente, en una placa picotituladora (pocillos de picolitros) se añaden los dNTPs, ATP sulfurilasa,

luciferasa, luciferina, ADN polimerasa y APS (adenosina 5'-fosfosulfato). Cuando uno de los dNTPs se une a la cadena molde por complementariedad, de manera que se libera una cantidad de pirofosfatos (PPi) equivalente a los nucleótidos que se han unido; estos pirofosfatos se transforman en ATP, que a su vez reaccionan la luciferina para dar oxiluciferina, lo que finalmente produce luz visible que se mide. Una apirasa degrada los nucleótidos que no se han unido, y se inyectan a continuación los de otra clase [106].

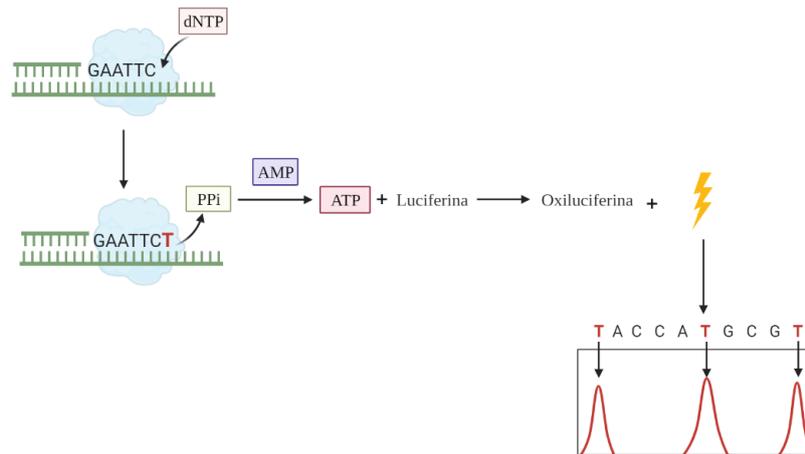


Figura 8. Secuenciación por pirosecuenciación. Editado con Biorender

La secuenciación por ligación (el caso del sistema SOLiD de Life Technologies (Applied Biosystems, como se muestra en la **Figura 9**) une los amplicones con adaptadores universales a una nanopartícula que a su vez se unirá a una lámina de vidrio con oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. La clave de esta técnica está en el uso de una ADN ligasa, una enzima que une ADN de doble cadena, de manera que al introducir un primer de secuenciación de longitud N y una sonda de 8 nucleótidos marcada con un fluorocromo (todos degenerados excepto los dos primeros para evitar errores de secuenciación) que se unirá al primer de secuenciación, la ADN ligasa actuará, liberando el fluorocromo (uno de los cuatro posibles), que será excitado y medido. El producto se desnaturaliza y se introduce un nuevo primer de secuenciación de longitud N-1, y así sucesivamente [107].

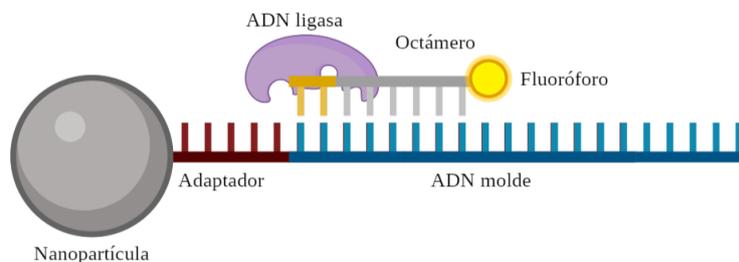


Figura 9. Secuenciación por ligación. Editado con Biorender

La secuenciación por síntesis (la utilizada por las plataformas de Illumina, como se muestra en la **Figura 10**) combina la clonación y terminadores reversibles para conseguir productos de secuenciación de mayor tamaño. Los fragmentos de ADN amplificados y a los que se han unido adaptadores se unen mediante estos a una lámina inerte y en la que van a crearse hasta 1000 copias del mismo ADN molde mediante terminadores marcados con un fluorocromo. En cada ciclo se unirán los terminadores correspondientes, cuyo marcador se excita y lee para a continuación eliminarlo enzimáticamente, lo que permite que se pueda unir otro terminador al que se acaba de degradar. Otra particularidad de esta tecnología es que la síntesis de la nueva cadena es en puente, pues los adaptadores de los fragmentos de ADN y de la lámina van en parejas, de modo que tras una desnaturalización se multiplican las cadenas de ADN molde, mejorando la secuenciación [108].

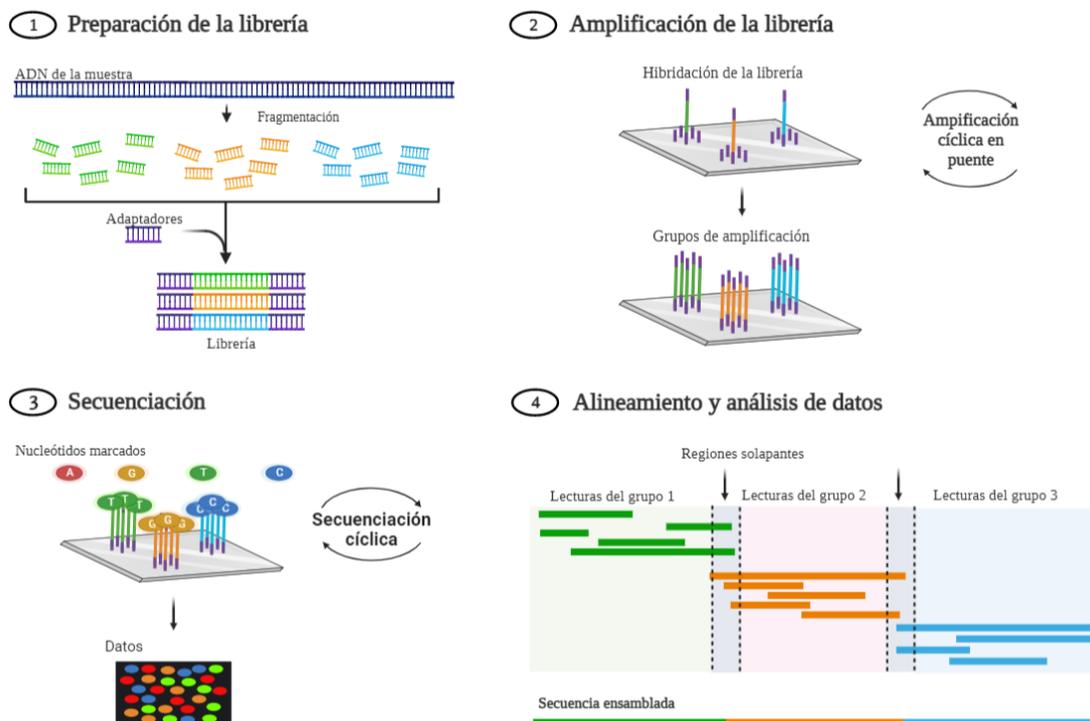


Figura 10. Secuenciación por síntesis. Editado con Biorender

La secuenciación por semiconducción (utilizada por las plataformas IonTorrent, véase la **Figura 11**) rompe moldes por no estar basada en la luz, sino en los semiconductores (elementos capaces de comportarse como conductores o como aislantes, dependiendo de determinados factores), en concreto un semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS por sus siglas en inglés). En esta técnica las librerías (creadas mediante PCR en emulsión mediante nanopartículas) son inundadas por uno de los cuatro nucleótidos, registrándose la unión de uno o más por la variación del pH en el medio resultante de su unión a la cadena. A continuación, el flujo de nucleótidos se retira y son otros los nucleótidos que pasan a la reacción, realizándose de esta manera la secuenciación [109].

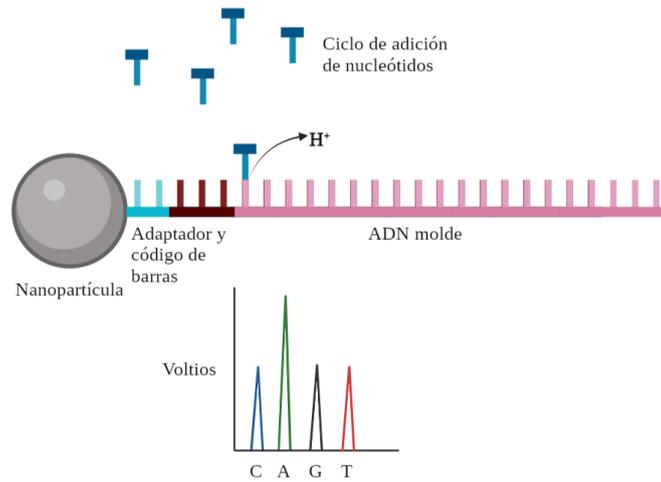


Figura 11. Secuenciación por semiconducción. Editado con Biorender

La tercera generación de secuenciación la constituyen las técnicas empleadas por Helicos BioSciences o Pacific Biosciences para la secuenciación a partir de una única molécula de ADN, o bien a partir de una única célula elimina los problemas de la segunda generación al no basarse en la amplificación, eliminando los artefactos y requisitos propios de la amplificación como es el tamaño del ADN a secuenciar. Aunque son diferentes las plataformas disponibles, todas utilizan la secuenciación por síntesis y un láser que excita los nucleótidos con fluorocromo que se van incorporando [110].

La cuarta y última generación utiliza la tecnología de los nanoporos, que saltaron a la palestra en 2014 con MinION de Oxford Nanopore Technologies. Esta tecnología se basa en nanoproteínas de poro o nanoporos embebidos en una membrana polimérica resistente a la electricidad, que funcionan como un biosensor. En una solución electrolítica se aplica un voltaje constante, de manera que el ADN, de carga negativa, va a pasar por el nanoporo al polo cargado positivamente a una velocidad controlada por una proteína motor. Así, se van a ir registrando los cambios en la corriente eléctrica, que estarán provocados por los diferentes nucleótidos que componen la molécula de ADN, lo que permite la secuenciación de una única molécula de ADN en tiempo real, y es que los nanoporos tienen actividad helicasa que permite obtener lecturas dobles de ADN bicatenario [111].

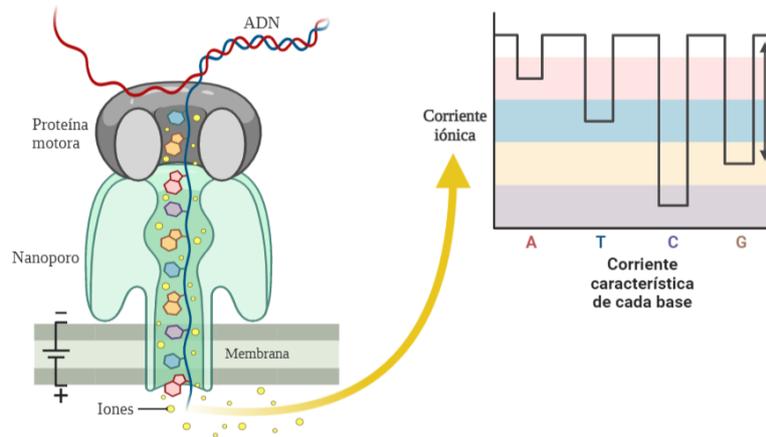


Figura 12. Secuenciación por nanoporos. Editado con Biorender

4.2. Plataformas actuales en el ámbito forense

En 2015 tuvo lugar en Países Bajos una agresión sexual, analizándose las ropas de la víctima con electroforesis capilar. Un año después una muestra en particular tuvo una coincidencia con la base de datos criminal nacional, arrojando la policía a un sospechoso. El abogado de la defensa, no obstante, contactó con el reputado experto Dr. Peter de Knijff para solicitarle una contra pericial, argumentando que el perfil con el que se acusaba a su defendido era un perfil mezcla con el perfil de la víctima y el de otro contribuyente en menos de un 10%. Se llegó a la misma conclusión: un perfil mezcla con un componente minoritario del que en muchos marcadores era imposible decidir si se trataba de un alelo o un stutter del perfil mayoritario, así que se liberó al acusado. En 2018 se utilizó el equipo MiSeq de Verogen para analizar la muestra, permitiendo distinguir mucho mejor entre alelos (compatibles con los del sospechoso) y stutters, declarándose posteriormente la culpabilidad de la persona de la que provenía el perfil minoritario. Esta fue la primera vez en la que se produjo una sentencia condenatoria utilizando NGS [112].

Desde su desarrollo, son múltiples las aplicaciones que se han propuesto en el ámbito forense para la secuenciación de nueva generación de ADN: secuenciación de STRs, secuenciación de SNPs, estudios de relación biológica, linaje y ancestralidad, y fenotípicos; es más, estudios de ARN permitirían determinar causa de la muerte, temporalidad de heridas, identificación de la fuente de una muestra, identificación de órganos, estimación del intervalo post-mortem, o datación de muestras [113], y con el estudio del microbioma se añaden todavía más posibilidades [114], como la identificación, la geolocalización, o la determinación del intervalo post-mortem [115].

Actualmente son dos las plataformas principales utilizadas en el ámbito forense: MiSeq FGx de Verogen (Illumina) y Ion S5 de ThermoFisher, la primera basada en la secuenciación por síntesis y la segunda en la secuenciación por semiconducción. Comparando ambas plataformas, un estudio analizó los mismos marcadores SNPs y observó un rendimiento similar en ambas:

mismos valores de cobertura y heterocigosidad, y un 99,7% [116]. Un ejercicio de intercomparación del GHEP llegó a la misma conclusión, debiéndose las discrepancias a la falta de cobertura de los marcadores que se reportaban, si bien se apuntó que el rendimiento de las plataformas Ion podría ser mejor teniendo en cuenta que sus paneles tienen menos marcadores, lo que aumentaría las lecturas [117]. El equipo MiSeq tiene un mayor tiempo de secuenciación y errores de sustitución, mientras que el equipo de ThermoFisher presenta más errores de tipo inserción o deleción, además de errores en homopolímeros de más de 6 pares de bases, con un mayor tiempo de preparación de las reacciones, si bien un elemento diferenciador importante es la automatización de la preparación de librerías y chips si se dispone de un Ion Chef™ [113].

Para estas plataformas son varios los kits disponibles, resultando normalmente en diferentes combinaciones de STRs autosómicos y SNPs, diversos tipos de SNPs en un solo ensayo, o análisis del ADN mitocondrial completo o únicamente la región control (véase la *Tabla 6*).

Tabla 6. Paneles comerciales de NGS

Panel	Marcadores	Amplicón (pb)
Verogen – MiSeq FGx		
ForenSeq DNA Signature Prep Kit [118]	Primer Mix A: 27 aSTRs, 24 Y-STRs, 7 X-STRs, 94 SNPs de identificación. Primer Mix B: 27 aSTRs, 24 Y-STRs, 7X-STRs, 94 SNPs de identificación, 22 SNPs fenotípicos, 56 SNPs de ancestralidad.	61-467
ForenSeq MainstAY [119]	Primer Mix C: 27 aSTRs, 25 Y-STRs Primer Mix D: 27 aSTRs+SE33, 25 Y-STRs	235
ForenSeq mtDNA Whole Genome Kit [120]	(1-16569)	131
ForenSeq mtDNA Control Region Kit [121]	(16008–595)	118
ForenSeq Kintelligence Kit [26]	56 SNPs de ancestralidad 94 SNPs de identificación 9867 SNPs de linaje 22 SNPs fenotípicos 106 X-SNPs 85 Y-SNPs	< 150
ForenSeq Imagen Kit [122]	Primer Mix E: 22 SNPs de pelo, 6 SNPs de color de ojos, 36 SNPs de pigmentación de la piel y 14 Y-SNPs. Primer Mix F-Geo: 22 SNPs de pelo, 6 SNPs de color de ojos, 36 SNPs de pigmentación de la piel, 56 SNPs de ancestralidad y 14 Y-SNPs	150-200
ThermoFisher – Ion Torrent [123,124]		
Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2	31 aSTRs Y indel SRY Amelogenina DYS391	170

Precision ID Identity Panel	90 aSTRs 34 Y-SNPs	138
Precision ID Ancestry Panel	165 SNPs ancestralidad	127
Precision ID mtDNA Whole Genome Panel	(1-16569)	163
Precision ID mtDNA Control Region Panel	(16024-576)	153
Ion Ampliseq VISAGE-Basic Tool Research Panel [58]	41 SNPs fenotípicos de HirisPlex-S 115 SNPs de ancestralidad	175
Ion Ampliseq DNA Phenotyping Panel [125]	23 SNPs fenotípicos	133
Ion AmpliSeq PhenoTrivium Panel [126]	200 SNPs de ancestralidad 41 SNPs fenotípicos de HirisPlex-S 79 Y-SNPs	78 (SNPs) 217 (Y-SNPs)
Ion AmpliSeq HID Y-SNP Research Panel v1 [127]	859 Y-SNPs	130
Ion AmpliSeq MH-74 Plex Research Panel [128]	230 SNPs para análisis de microhaplotipos	157-325
Promega – MiSeq FGx		
PowerSeq® 46GY System [129]	22 aSTRs 23 Y-STRs Amelogenina	140-300
PowerSeq® CRM Nested System [130]	(1-16569)	144-237
QIAGEN – MiSeq FGX/Ion Torrent [131]		
QIAseq Investigator Missing Persons SNP panel	1200 SNPs de linaje 34 X-SNPs 55 SNPs de ancestralidad	-
QIAseq Investigator ID SNP panel	139 SNPs de identificación	-
QIAseq Investigator Global Ancestry SNP panel	102 SNPs de ancestralidad	-
QIAseq Investigator Middle East Ancestry SNP panel	85 SNPs de ancestralidad	-
QIAseq Investigator Microhaplotype panel	-	-
QIAseq Human Mitochondria panel	(1-16569)	-
QIAseq Investigator Human Mitochondria Control Region panel	(15971-16411)	-

Las técnicas de secuenciación de nueva generación han sido probadas con éxito, obteniendo más resultados positivos y más información genética que con la electroforesis capilar [132], permitiendo esta característica aumentar el LR que se proporciona en las conclusiones de los informes forenses [133].

Teniendo en cuenta todas las ventajas analíticas (véase la *Tabla 7*), sumado al interés en la tecnología reflejado en la bibliografía, cabe preguntarse por qué no se aplica en el ámbito

forense tanto como cabría esperar. La falta de financiación (acentuada con el precio de las plataformas y sus consumibles), o la necesidad de entrenamiento en análisis de datos bioinformáticos, la ausencia de una nomenclatura única, la falta de compatibilidad con las bases de datos de ADN o la ausencia de un número suficiente de estudios poblacionales y de validación son algunos de los motivos que los expertos forenses señalan para no implementar la NGS en sus laboratorios [134]. Con todo, está claro que la secuenciación masiva va a ser una herramienta que se va a implementar cada vez más en los laboratorios forenses, aunque todavía hay mucho trabajo por hacer, siendo las siguientes las líneas de trabajo a afrontar [135]:

- 1) Nomenclatura uniforme de alelos.
- 2) Número mínimo de lecturas para un alelo teniendo en cuenta si es una muestra de referencia, dubitada o mezcla.
- 3) Estrategias de secuenciación masiva definidas.
- 4) Formatos para almacenar los resultados de MPS.
- 5) Requisitos mínimos de información del software de análisis de datos de NGS.
- 6) Paquetes de software estadístico para NGS.

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes del análisis de ADN mediante NGS [113]

Ventajas	
Poder de discriminación	-Isoalelos (variaciones en secuencia de STRs) -SNPs en regiones flanqueantes -Mayor número de marcadores
Stutters	-Mejor detección al depender de la secuencia de los STRs
Mezclas	-Identificación de secuencias extra -Mejor poder frente a identificaciones adventicias -Proporción de mezcla mejor calculada con el número de lecturas
Muestras de agresión sexual	-Kits con gran número de aSTRs e YSTRs
Muestras degradadas	-Tamaño de amplicón mínimo -Análisis simultáneo de un gran número de SNPs
Estudios poblacionales	-Microhaplotipos de regiones flanqueantes
ADN mitocondrial	-Mayor poder de discriminación, mejor discriminación de haplotipos, y mejor análisis de ancestralidad matrilineal al secuenciar todo el genoma mitocondrial. -Fragmentos solapantes (muestras degradadas)
Inconvenientes	
Marcadores problemáticos	MiSeq FGx: DYS389II, DYS448, DXS10148, rs459929, rs1029047, rs2399332, rs7251928, rs7722456, rs10488710, T10873C Ion Torrent: D3S1358, D7S820, D8S1179, rs321198, rs576261, rs917118, rs4530059, rs1031825
Problemas analíticos	-Cobertura desigual de amplicones de mtDNA -Siguen los problemas de lectura en regiones de poliC
Protocolos y nomenclatura	-No hay establecidos umbrales de número de lecturas -Falta de nomenclatura para las variaciones en secuencia de STRs
Estudios poblacionales	-No hay datos poblacionales de variaciones en secuencia de STRs

5. Secuenciación de ADN antiguo

Aunque virtualmente constituyen dos mundos diferentes, las herramientas utilizadas por los estudios de ADN antiguo, cuyas muestras pueden tener miles de años, pueden ser de una gran utilidad para las muestras desafiantes a las que se enfrenta la ciencia forense, como ya se ha señalado [136]. En este epígrafe estudiaremos las dos técnicas principales de secuenciación que se manejan en este ámbito: *shotgun* y la hibridación con captura, utilizándose la primera como herramienta general de análisis y la segunda para aquellos casos en los que las muestra tienen un contenido escaso en ADN endógeno [137]. En la **Figura 13** se muestra el flujo de trabajo de un laboratorio de ADN antiguo.



Figura 13. Flujo de trabajo de un laboratorio de ADN antiguo

Después de la extracción y cuantificación de las muestras (etapas analíticas ya vistas en sus respectivos capítulos), ha de determinarse la presencia de ADN endógeno (el genuino ADN antiguo de la muestra en cuestión) y exógeno (ADN moderno contaminante y/o ADN antiguo que no pertenece a la muestra) en los extractos conseguidos, lo que algunas veces se denomina autenticación del ADN antiguo (véase la **Figura 14**). Recordemos que, tras la muerte del individuo, el material genético se ve afectado por diversos procesos de degradación, como son la fragmentación y la desaminación de las citosinas, que acaban formando uracilo, viéndose en la secuenciación como falsas timinas (usualmente se indica como C→T, aunque también se observa G→A en sentido 5'→3' tras una amplificación). Teniendo en cuenta que el primer mecanismo puede darse en muestras de ADN moderno, el segundo constituye el verdadero indicador del mismo [138].

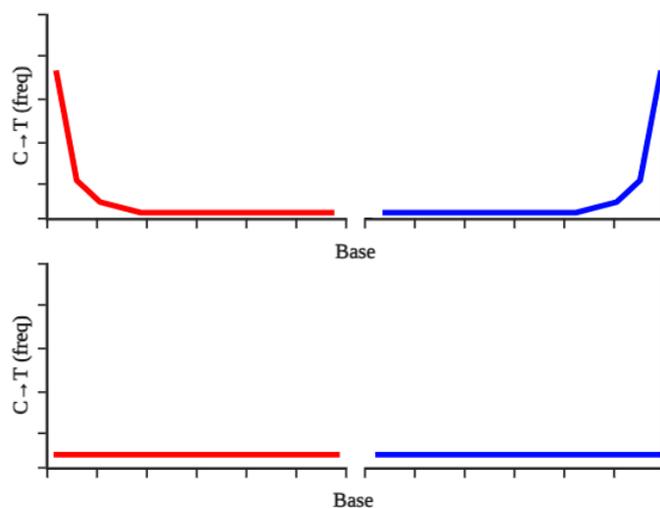


Figura 14. Patrones de daño del ADN. Arriba, ADN endógeno (antiguo). Abajo, ADN exógeno (moderno)

5.1. Preparación de la librería

La siguiente etapa del flujo consiste en, una vez tenemos las muestras extraídas y cuantificadas, preparar la librería. Las librerías pueden ser monocatenarias o bicatenarias, teniendo como principal diferencia que la primera estrategia permite la secuenciación de moléculas de menor tamaños (tanto que en ocasiones no se pueden mapear con respecto a la secuencia de referencia), si bien el éxito de esta estrategia depende en gran medida de la proporción entre los diferentes tamaños de moléculas de ADN existentes en la muestra, por lo que es peligroso adoptarlo como estrategia estándar [139].

Hay varias estrategias publicadas para hacer una librería, como es el método BEST (*blunt-end-single-tube*) [140], ssDNA 2.0 (*single-stranded*) [141], o la reacción de Santa Cruz (SCR) [142], siendo este último el mejor en términos de coste-beneficio [143]. La preparación de la librería es un proceso complejo en el que intervienen varias reacciones enzimáticas, que desglosaremos a continuación.

1) Reparación del ADN antiguo

Hay tres posibles estrategias para la reparación del ADN [144]: no repararlo, repararlo completamente, o repararlo parcialmente. La no reparación tiene la desventaja de no poder identificar los polimorfismos verdaderos por los problemas de alineamiento que tendrá con la secuencia de referencia. La reparación completa tiene la desventaja de la pérdida de información con los cambios C→T y G→A, así como el no poder distinguir entre ADN antiguo y ADN moderno en los resultados. Pero si lo reparamos parcialmente, es decir, dejando los uracilos que se encuentren en los extremos de los fragmentos, recuperaremos la información correcta y original al tiempo que disponemos de un marcador para distinguir el ADN endógeno del exógeno.

Los uracilos presentes en el ADN pueden eliminarse mediante un tratamiento con uracil-ADN-glicosilasa (UDG), una enzima que dejará los huecos en la secuencia [145]. Otra opción es utilizar USER, una combinación de UDG y endonucleasa VIII [146], que reparará los uracilos de las secuencias excepto aquellos que se encuentren en los extremos de los fragmentos, que actuarán en la secuenciación como un marcador de ADN antiguo. Finalmente, los extremos de los fragmentos se “pulen” para facilitar la unión de los adaptadores, usándose la enzima T4 PNK [144], que fosforila el ADN. Se añade también a la reacción T4 DNA polimerasa, que tiene actividad exonucleasa, lo que hará que los fragmentos complementarios de librería tengan el mismo tamaño.[147]. Esta fase acaba con una purificación con, por ejemplo, MinElute®.

2) Ligación

En esta etapa se unen los adaptadores a los fragmentos mediante una reacción con ADN ligasa y PEG-4000, polietilenglicol que actúa como estabilizante al impedir la unión entre proteínas y ADN [148].

3) Rellenado.

Este último paso tiene el objetivo de extender los adaptadores que se han ligado previamente, los cuales se encontraban truncados para evitar que hibridaran entre ellos en una reacción en la que el ADN no se separa a altas temperaturas, sino que se utiliza una polimerasa especial, la Bst DNA polimerasa (del *Bacillus stearothermophilus*) [149], con actividad a temperatura fisiológica.

Finalmente, la librería se cuantifica mediante qPCR para comprobar que la misma se ha realizado correctamente, así como para ajustar los parámetros del siguiente paso.

5.2. Indexación

Esta etapa consiste en añadir a las librerías el oligonucleótido que las va a identificar y que nos va a permitir secuenciar varias librerías a la vez. Normalmente se utilizan los índices P5 y P7 de Illumina, de manera que si se diseñan 96 índices P5 y 96 índices P7, podemos obtener hasta 9216 combinaciones [150]. En este paso se hace una primera amplificación de la librería, en la que se replicarán tanto los fragmentos de ADN como los adaptadores y sus índices. El último paso consiste en una purificación, normalmente con partículas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Una vez hecha la indexación, se comprueba que tenemos una librería de ADN antiguo analizando el tamaño de los fragmentos de la misma (un ejemplo de resultado se muestra en la **Figura 15**). La preparación de la librería tras la extracción del ADN de las muestras es el paso previo a la secuenciación masiva. La cuantificación en este caso permite asegurar una correcta secuenciación, para lo que hay disponibles nuevamente diferentes aproximaciones: NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), Qubit® (Life Technologies™), Bioanalyzer 2100 High Sensitivity Assay (Agilent Technologies), TapeStation (Agilent Technologies), GX Touch 24 (PerkinElmer®). En comparación, TapeStation, Bioanalyzer y Qubit son las que dan resultados más exactos de cuantificación, siendo sin embargo Bioanalyzer más preciso cuando las concentraciones de ADN son bajas (2-4 pg/μl) [151]. Este tipo de ensayos permiten determinar, no solamente la cantidad de ADN humano presente en la muestra, sino también el ADN exógeno, además de dar información sobre la longitud de los fragmentos presentes, y por tanto de ADN antiguo, además de no estar afectada por la acción de inhibidores dada la naturaleza no enzimática de las reacciones [152]. Los ensayos de High Sensitivity DNA Kit de Agilent (para instrumentos Bioanalyzer y TapeStation, así como para LabChip GX Touch) se basan en reacciones en chips

que contienen un conjunto de microcanales interconectados que separan fragmentos de ADN en base a su tamaño, forzándolos a pasar por ellos mediante una electroforesis en gel [153]. Por su parte, el kit Agilent DNF-474 HS NGS Fragment Kit, diseñado para equipos Fragment Analyzer (Agilent) se basan en la electroforesis capilar [154].

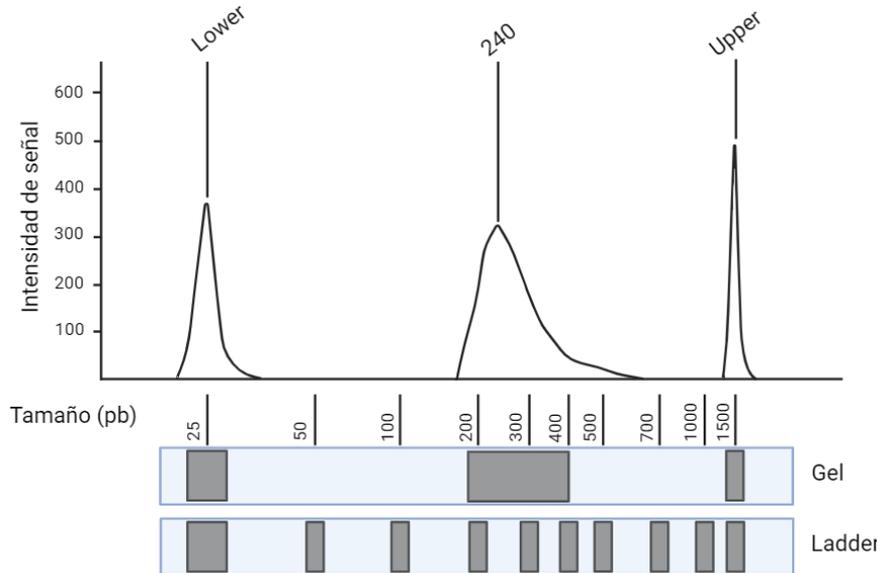


Figura 15. Electroferograma de TapeStation de una buena librería. Se observan los picos de menor y mayor tamaños (lower y upper respectivamente), así como el promedio de pares de bases de la librería

5.3. Shotgun sequencing

La técnica de secuenciación por *shotgun*, también conocida como metagenómica, es la más utilizada en los estudios de ADN antiguo [155,156]. Esta técnica consiste en la secuenciación en paralelo de múltiples fragmentos de ADN, reconstruyéndose la secuencia de la muestra mediante la lectura de las secuencias de estos fragmentos solapantes [157].

La secuenciación de ADN antiguo mediante *shotgun* aporta información acerca de la abundancia relativa de ADN endógeno y exógeno de la muestra, permitiendo la incluso la obtención de información en muestras relativamente recientes o preservadas en ambientes como el *permafrost*. Del *shotgun* puede obtenerse también información acerca del tamaño de los fragmentos de ADN, que difícilmente excederá de los 400 pares de bases, pudiendo encontrar muestras con incluso menos de 100 pb. Esta estrategia resulta aplicable únicamente en muestras muy bien conservadas, especialmente teniendo como objetivo el estudio de ADN mitocondrial por su alta abundancia, por lo que el estudio del ADN antiguo requiere la aplicación de técnicas de enriquecimiento [158], ya sea por PCR o por captura por hibridación.

Habitualmente se trabaja comprobándose el tamaño de los fragmentos mediante una electroforesis en chip (Bioanalyzer de Agilent), y la composición de la secuencia observando los alineamientos y desalineamientos con una secuencia de referencia [159]. El primer paso para la

secuenciación masiva de ADN antiguo es identificar los fragmentos diana, es decir, identificar de forma fiable los fragmentos de ADN endógeno con el fin de que sean los únicos que se secuencien. Teóricamente hay dos maneras de detectar cuántos fragmentos de ADN endógeno hay en una muestra si sólo hay presente una contaminación microbiana natural: o bien se identifican y posteriormente se eliminan las secuencias de ese ADN bacteriano, o bien se detecta el ADN endógeno comparándolo con una secuencia conocida, siendo la segunda opción la que normalmente se utiliza teniendo en cuenta nuestro desconocimiento del ADN microbiano [160].

5.4. Enriquecimiento mediante captura por hibridación

En un primer momento los estudios de ADN antiguo utilizaron fragmentos solapantes amplificados por PCR, sin embargo, este enfoque tenía, entre otros problemas, la degradación del ADN de partida o la imposibilidad de secuenciar regiones grandes, por lo que el enriquecimiento por hibridación ha acabado por convertirse en la regla de oro del ADN antiguo. La misma puede desarrollarse en solución o en un soporte sólido (array), encontrándose (unidos al array o a partículas magnéticas mediante enlaces de estreptavidina-biotina, dependiendo de si se hace en sólido o en solución respectivamente) unas sondas de ADN a la que se van a unir los fragmentos diana de la librería; las moléculas que han quedado sin unir se lavarán y quedarán las secuencias objetivo [161]. Este proceso se muestra esquemáticamente en la **Figura 16**.

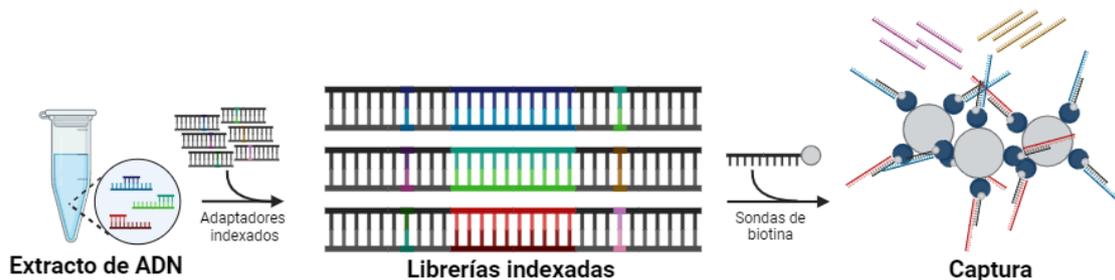


Figura 16. Esquema del enriquecimiento con captura por hibridación. Editado con Biorender por Peter A. Webb

La mayoría de las publicaciones de enriquecimiento se basan en la hibridación en solución, utilizando el panel conocido como “1240k”, esto es, una metodología capaz de recuperar más de un millón de SNPs de restos antiguos [162]. Más adelante se desarrolló un kit comercial para el enriquecimiento, el kit de myBaits® WGE (Arbor biosciences, Am Arbor, MI, USA), que consta de 4 paneles modulares: el tradicional de 1240k SNPs, uno ancestral de 850k SNPs, uno de cromosoma Y de 46k SNPs, y uno de ADN mitocondrial [163]. Por su parte, el kit de Twist ancient DNA (Twist, South San Francisco, CA, USA), utiliza sondas de 80 pb y un núcleo de los 1240k SNPs de los cromosomas 1-22 y X añadiendo 81.925 del cromosoma Y, y 94.586 SNPs fenotípicos (incluyendo también SNPs relacionados con factores de selección natural, enfermedades raras, o rasgos genéticos complejos como la altura) al que se le puede añadir un panel de ADN mitocondrial, y que cuenta con la posibilidad de diseñar paneles personalizados

[164]. Una comparativa entre estas tres metodologías coloca al kit de Twist como mejor en cuanto a cobertura, uniformidad y menor parcialidad [165]. En ocasiones se ha señalado la efectividad de hacer el protocolo de enriquecimiento dos veces seguidas, que parece resultar en un aumento de su eficacia; sin embargo, haciendo un balance entre los posibles beneficios de esta repetición y el tiempo y los reactivos necesarios, se recomienda hacer solamente una ronda de enriquecimiento [165].

Son varias las ventajas que ofrece el enriquecimiento por captura frente al enriquecimiento por PCR: es menos susceptible al desalineamiento de los cebadores (útil para muestras con secuencia desconocida o tan dañadas que los cebadores no hibridan), es menos sensible a la contaminación (no tiene preferencia por las moléculas de mayor tamaño propias del ADN moderno), y menos vulnerable a las inserciones de ADN mitocondrial en el ADN nuclear (NUMTs), que se amplifican preferentemente en el enriquecimiento por PCR [166].

El ámbito forense no ha sido ajeno al potencial de esta técnica, pudiendo encontrarse un par de ejemplos de su utilización en la literatura científica. Así, se ha observado que ha permitido una mayor recuperación de marcadores en muestras degradadas artificialmente con calor [167]; el enriquecimiento, también con partículas magnéticas, para secuenciación del genoma mitocondrial completo [168]; la aplicación de un protocolo completo de ADN antiguo en el análisis de ADN mitocondrial de restos óseos degradados [169], y su aplicación en un panel con SNPs de ancestralidad, fenotípicos, y del cromosoma Y [170], o un panel con SNPs de identificación, de los cromosomas sexuales, de ancestralidad, y fenotípicos [171].

Son varios los factores que hay que tener en cuenta a la hora de pensar en la aplicación de esta técnica en el ámbito forense. El primero de ellos es el tiempo: los protocolos de preparación de librerías son largos y laboriosos, aumentando el esfuerzo económico a invertir en un ya de por sí costoso proceso como es la secuenciación masiva; el segundo, es que los STRs no son muy susceptibles de estudiar con esta técnica, más bien diseñada para el análisis de SNPs; sin embargo, se han conseguido resultados prometedores con respecto a la recuperación de información genética de muestras muy degradadas, además de que, al no contar con las limitaciones de la PCR (que reducen el número posible de SNPs de los paneles a 100-200), se podrían secuenciar al mismo tiempo cientos e incluso miles de SNPs [172], lo que abre un enorme abanico de posibilidades como la facultad de poder autenticar el ADN endógeno, cosa que no puede conseguirse con la amplificación los métodos basados en la PCR.

5.5. Bioinformática

Una vez obtenidos los datos de secuenciación masiva, surge la necesidad de mapear los fragmentos (alinearlos con una secuencia de referencia) y eliminar los datos relativos al ADN moderno [173]. Para ello se han desarrollado diferentes herramientas informáticas llamadas

pipelines: procesos interconectados que corren en paralelo, siendo las salidas de uno las entradas de otro [174].

Los *pipelines* más utilizados en el análisis de datos de aDNA son PALEOMIX y EAGER, ambos con una aproximación similar al combinar el análisis de datos de Illumina (control de calidad de las secuencias, eliminación de los datos de los adaptadores, mapeado, etc.) y herramientas propias del análisis de datos de aDNA (evaluación del daño del ADN, mapeado de moléculas cortas); con el tiempo se han observado deficiencias que se suplieron con la síntesis de ambas soluciones en el *pipeline* nf-core/eager [175]. Un esquema del funcionamiento de este software se muestra en la **Figura 17**.

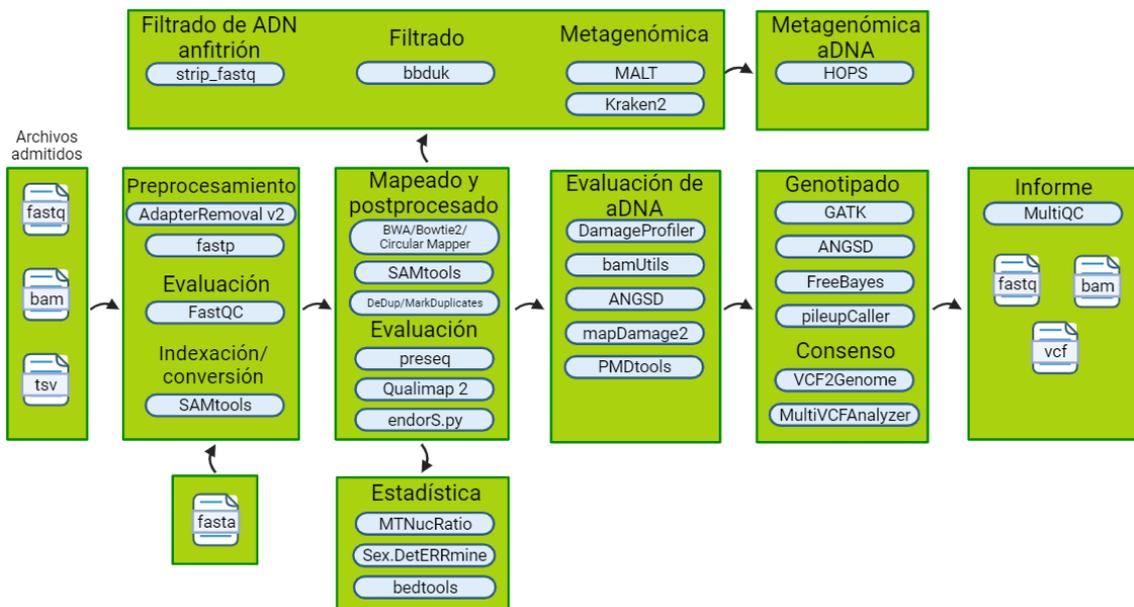


Figura 17. Esquema del *pipeline* nf-core/eager

6. Experimento #7. Estudio piloto de las aplicaciones de las técnicas de aDNA en muestras forenses

El objetivo de este ensayo es determinar la aplicabilidad de las técnicas de enriquecimiento utilizadas en los estudios de aDNA en muestras forenses.

6.1. Muestras

Para este estudio se escogió un conjunto de seis muestras analizadas previamente con auSTRs: dos con perfil completo, dos con perfil parcial, y dos con perfil negativo. Las muestras, detalladas en la **Tabla 8**, proceden de fosas comunes de Andalucía del contexto de la Guerra Civil y la posguerra española.

Tabla 8. Muestras de restos óseos analizadas en el Experimento #7

Muestra	1	2	3	4	5	6
Tipo	Petroso	Petroso	Fémur	Fémur	Fémur	Fémur

6.2. Material y métodos

Todos los procedimientos previos a la amplificación de las muestras se llevaron a cabo en instalaciones dedicadas a las muestras mínimas, siguiendo los estándares internacionales de trabajo con ADN antiguo [176].

Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo siguiendo un protocolo interno basado en la extracción orgánica [177]: a un gramo de pulverizado de resto óseo se le añadieron 5 ml de tampón de lisis (compuesto por EDTA, proteinasa K, DTT, y SDS), dejándose incubar toda la noche. El lisado se mezcló con 4 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y el sobrenadante se concentró en filtros Amicon® Ultra-4 de 30 kDa para, finalmente, purificarse con columnas MinElute® de QIAGEN.

Cuantificación de ADN

Los extractos de ADN se cuantificaron en un equipo de qPCR QuantStudio™ 5 (ThermoFisher), utilizando el kit Quantifiler™ Trio siguiendo las recomendaciones del fabricante [178]: en una placa óptica se prepararon cinco estándares por duplicado y dos NTC, añadiendo a cada reacción 2 µl de muestra, que se cuantificaron por duplicado.

Amplificación de auSTRs

Las muestras de ADN se amplificaron con el kit de STRs autosómicos GlobalFiler™ (ThermoFisher), con las condiciones indicadas por el fabricante tanto para el termociclador como

para la electroforesis capilar [179], que se realizó en un equipo ABI 3500 (ThermoFisher). Los datos se analizaron en el software GeneMapper™ ID-X v1.4.

Preparación de librerías

A partir de los extractos de ADN se generaron librerías de doble cadena utilizando un método de tratamiento parcial con UDG [180], realizándose los pasos de validación y cuantificación de las librerías con el kit de alta sensibilidad de Qubit (ThermoFisher) y TapeStation (Agilent).

Enriquecimiento y secuenciación

Las mismas librerías fueron reamplificadas para obtener una cantidad de ADN suficiente para la captura, utilizando 25 µl de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche), con 5 µl de primers IS5 e IS6 a 10 µM y 12,5 µl de agua ultrapura para completar la reacción, con unas condiciones de amplificación de 98°C (2 min), 15 ciclos de 98°C (20 s), 56°C (30 s), y 72°C (45 s), con una extensión final de 72°C (5 min). Las librerías amplificadas se purificaron con las partículas magnéticas 1.2x AmpureXP a un volumen final de 30 µl.

El enriquecimiento se hizo en una única ronda con el kit Twist de Bioscience [164] siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando los paneles de 1240k SNPs y el genoma mitocondrial completo. Las librerías antes del enriquecimiento se secuenciaron por *shotgun* en un equipo NextSeq High-Output paired end 75 (Illumina).

Análisis de datos de la librería pre-enriquecimiento

Los datos se procesaron mediante el paquete bioinformático de ADN antiguo nf-core/EAGER en su versión 2.4.6 [175]. Las lecturas con un umbral de 25 pares de bases se mapearon con el genoma humano de referencia CRCh37d5 [181] y la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS). Para el post procesamiento de la secuencia alineada se utilizaron las SAMtools mpileup. La autenticidad del ADN antiguo, el contenido de ADN endógeno, la distribución de los fragmentos y el daño molecular se determinaron con el paquete DamageProfiler [182].

6.3. Resultados y discusión

Los resultados de cuantificación (cantidad de ADN de la diana pequeña, cantidad de ADN de la diana grande, cantidad de ADN del cromosoma Y, e índice de degradación), así como los resultados del perfil genético de STRs autosómicos obtenido de cada muestra (número de alelos que superan el umbral analítico, número de alelos que superan el umbral estocástico, RFU promedio y número de loci) se muestran en la **Tabla 9**.

En cuanto a su rendimiento, las muestras pueden dividirse en dos grupos: las dos primeras muestran tener una buena cantidad de ADN, dando un perfil genético casi completo. Las dos siguientes tienen una cantidad de ADN ligeramente superior al patrón más pequeño de

cuantificación, dando un perfil parcial. Finalmente, las dos últimas muestras dan resultados pobres de cuantificación (por debajo del último patrón), alcanzando un perfil no reportable.

Tabla 9. Resultados de cuantificación (Quantifiler™ Trio) y amplificación de STRs autosómicos (Globalfiler™).

Sample	Type	QTRIO Small	QTRIO Large	QTRIO Y	QTRIO Deg	Alleles >AT	Alleles >ST	RFU	Loci
1	Petroso	1,2260	0,0518	0,8391	24	31	27	5202	18
2	Petroso	2,2091	0,1200	1,4168	18	37	33	7339	18
3	Fémur	0,0040	0,0002	0,0039	20	20	7	382	10
4	Fémur	0,0077	0,0008	0,0054	10	15	0	140	6
5	Fémur	0,0026	0,0001	0,0022	26	8	0	113	3
6	Fémur	0,0015	0,0002	0,0013	8	7	1	174	1

Los resultados de la secuenciación por *shotgun* se muestran en la **Tabla 10**: número de lecturas, porcentaje de ADN endógeno, número de SNPs detectados, lecturas de ADN mitocondrial, media de tamaño de los fragmentos, sexo, y contenido de GC.

Tabla 10. Resultados de *shotgun*: número de lecturas, contenido de ADN endógeno (después de eliminar las lecturas <25 pb y quitar los duplicados de PCR), número de SNPs detectados, lecturas de ADNmt, tamaño medio de los fragmentos, determinación del sexo, contenido de guanina y citosina (tras eliminar lecturas cortas y duplicados).

Muestra	Lecturas (n)	Lecturas mapeadas (n)	Lecturas filtradas (n)	ADN endógeno (%)	SNPs (n)	Lecturas de ADNmt (n)	Tamaño fragmentos (\bar{x} pb)	Sexo (V/M)	Contenido de GC (%)
1	8.250.539	2.580.503	2.115.402	25,20	54.610,00	634	66	V	37
2	7.986.970	2.335.792	1.915.737	23,57	50.059,00	543	66	V	37
3	6.090.512	11.219	8.537	0,14	194	17	62	V	39
4	7.399.781	8.052	6.466	0,09	170	10	62	V	42
5	14.219.987	9.599	7.667	0,05	173	4	57	V	39
6	40.706.560	9.769	7.435	0,03	25	0	56	V	41

De los resultados de secuenciación por *shotgun* se desprenden las mismas conclusiones que por amplificación de STRs autosómicos, encontrándonos con los mismos grupos de muestras previamente descritos: las dos primeras, que obtienen buenos resultados, y el resto, con resultados más pobres, siendo las dos últimas muestras las peores en cuanto a resultados obtenidos. El mayor número de lecturas de la muestra 6 se debe a un error en la cantidad de *input* que se fijó en la preparación de la secuenciación; no obstante, la calidad y cantidad de ADN de la muestra se refleja en los otros parámetros.

No obstante, con la aplicación de esta técnica se ha obtenido también nueva información. En primer lugar, se ha observado que estas muestras de ADN, pese a tener consideración de forense, presentan los mismos patrones de degradación y daño molecular que el ADN antiguo: tamaño de fragmentos pequeño y daño molecular observado como C → T, como se desprende de la cantidad de ADN endógeno observada (**Figura 18**). Esto tiene la implicación de no solamente aportar un perfil genético, sino también de disponer de indicadores que permitan asegurar que el

resultado que se está dando se corresponde con ADN endógeno de la muestra. El contenido de GC también es un indicador para la presencia de ADN humano, que presenta en torno al 40% de guanina y citosina [183].

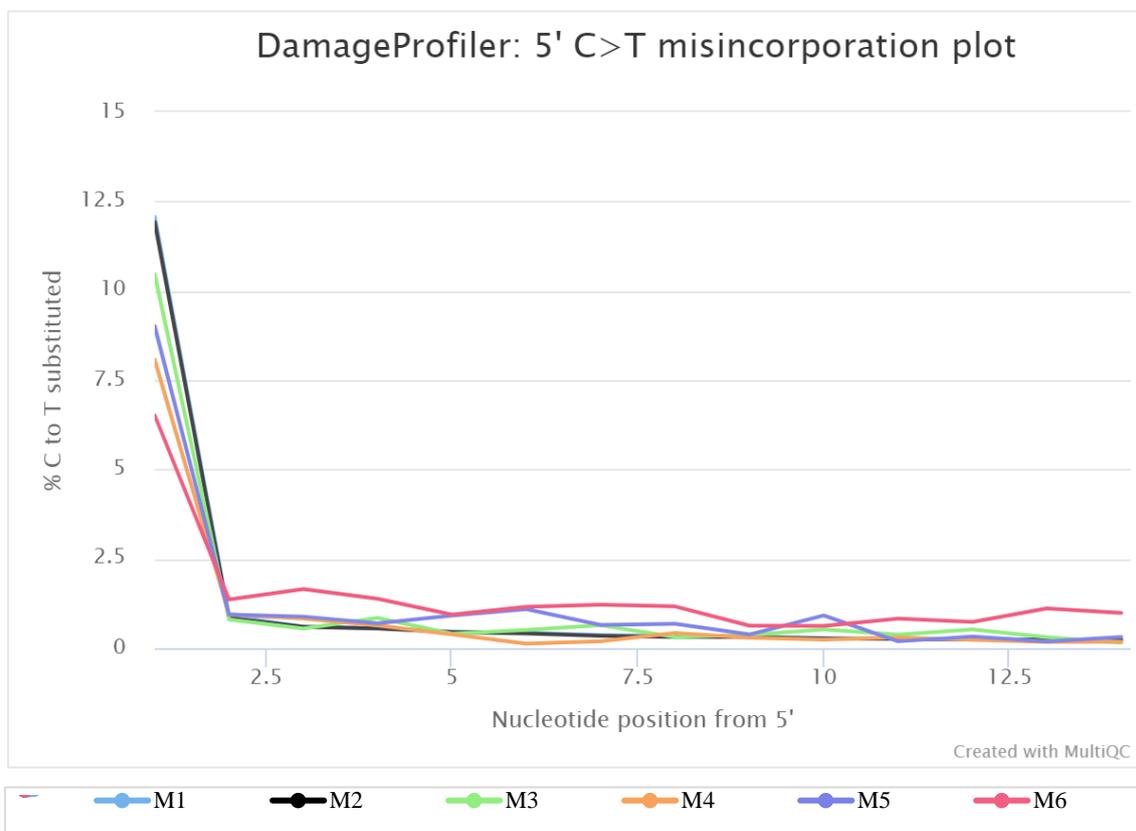


Figura 18. Gráfica de patrón de daño molecular C>T en sentido 5'.

Un reciente estudio realizado en muestras de restos óseos de la II Guerra Mundial (1939-1942) y la Guerra de Corea (1950-1953) utilizó en estas muestras tres métodos de preparación de librerías con y sin reparación del ADN, con captura posterior del ADN mitocondrial, mejorando el perfil genético que habían obtenido previamente con técnicas propias del análisis de ADN en el ámbito forense [184]. Al igual que nosotros, el estudio llega a la conclusión de que sus muestras presentan el mismo patrón de degradación y daño molecular que las muestras de ADN antiguo, por lo que las técnicas de análisis propias de esta metodología constituyen una poderosa fuente de información.

Para el momento de la presentación de esta tesis sólo han podido exponerse los resultados de *shotgun*, estando los análisis de secuenciación de la captura de ADN de estas muestras actualmente en desarrollo. Sin embargo, estos resultados preliminares tienen el valor de informar sobre la autenticidad del ADN de las muestras así como el sexo biológico de los individuos, y por tanto de los resultados de los perfiles genéticos obtenidos.

En los últimos años se ha planteado en la bibliografía forense la posibilidad de introducir las técnicas de análisis de ADN antiguo en el ámbito forense para muestras especialmente desafiantes, como es el caso de los restos óseos [136]. No obstante, se corre el riesgo de idealizar los resultados que pueden dar los estudios de aDNA, teniendo en cuenta que estos estudios son capaces de dar resultados con muestras de miles de años de antigüedad. Este estudio pretendía comprobar la aplicabilidad de estas técnicas en muestras forenses desafiantes, como son los restos óseos que se han analizado. A falta de secuenciar las librerías tras el enriquecimiento por captura, se ha podido obtener información valiosa con los resultados de *shotgun*.

En primer lugar, se ha podido comprobar que las muestras analizadas, pese a ser consideradas y tratadas como muestras forenses, reúnen tanto por su tamaño medio de fragmentos como por la acumulación de daño molecular, características con el aDNA. Esto permite determinar la presencia de ADN endógeno a partir de los indicadores usados en el aDNA, lo que puede resultar muy valioso para la comunidad forense, pues supondría un interesante criterio de autenticidad de los resultados.

En segundo lugar, se ha visto que las técnicas de aDNA no constituyen ninguna solución “mágica”: las muestras que previamente dan buenos resultados por STRs vuelven a dar buenos resultados en cuanto a librería y secuenciación, reproduciéndose esta igualdad de resultados en las muestras en peor estado.

En definitiva, las técnicas de análisis de aDNA pueden constituir una potencial herramienta a implementar en el ámbito forense. Como argumentos en contra se pueden esgrimir tanto el alto precio del equipamiento y reactivos necesarios como el tiempo, tanto de labor técnica como de análisis de datos y bioinformática, si bien es cierto que hay disponibles robots automatizados que pueden facilitar la labor analítica, con la contrapartida de su alto precio. En este sentido sólo podemos esperar a los avances de la industria, en la medida en que sean capaces de dotar a los laboratorios de un procedimiento sencillo y, en la medida de lo posible, automatizado, de preparación de librerías, enriquecimiento y análisis de datos.

6.4. Conclusiones

En la última década la bibliografía viene señalando el interés potencial en utilizar las técnicas empleadas por los estudios de ADN antiguo en muestras forenses, teniendo en cuenta la capacidad de generar datos en muestras de restos óseos o dentales en muestras con cientos o miles de años de antigüedad.

El presente estudio tenía el objetivo de estudiar la implementación de estas técnicas en el análisis de muestras forenses. Para ello se analizaron 6 muestras de restos óseos (dos huesos petroso y seis fémures) con los kits de cuantificación Quantifiler™ Trio y el kit de amplificación de STRs autosómicos Globalfiler™. De esos mismos extractos se prepararon sendas librerías con

el método de reparación parcial del ADN, secuenciando por *shotgun* las mismas. Finalmente, se enriquecieron las librerías con el kit Twist de Bioscience.

Los resultados preliminares de *shotgun* han mostrado que las muestras analizadas tienen las mismas características, en términos de degradación (tamaño medio de los fragmentos) y daño molecular (C>T) que otras muestras de ADN antiguo. Estos resultados permiten poner en valor las técnicas de aDNA, en cuanto a la validación de los resultados obtenidos en el ámbito forense mediante un estudio exhaustivo del ADN endógeno de las muestras.

7. Referencias

- [1] B. Budowle, J.V. Planz, R.S. Campbell, A. j. Eisenberg, Single Nucleotide Polymorphisms and Microarray Technology in Forensic Genetics - Development and Application to Mitochondrial DNA, *Forensic Science Review* 16 (2004) 21–36.
- [2] S.T. Sherry, M.H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E.M. Smigielski, K. Sirotkin, DbSNP: The NCBI database of genetic variation, *Nucleic Acids Research* 29 (2001) 308–311. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>.
- [3] H. Rajeevan, U. Soundararajan, J.R. Kidd, A.J. Pakstis, K.K. Kidd, ALFRED: an allele frequency resource for research and teaching, *Nucleic Acids Research* 40 (2012) D1010–D1015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr924>.
- [4] H. Rajeevan, U. Soundararajan, A.J. Pakstis, K.K. Kidd, Introducing the Forensic Research/Reference on Genetics knowledge base, FROG-kb, *Investigative Genetics* 3 (2012). <https://doi.org/10.1186/2041-2223-3-18>.
- [5] J.M. Butler, Y -Chromosome DNA Testing, in: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, Waltham, 2012: pp. 371–403.
- [6] B. Budowle, A. Van Daal, Forensically relevant SNP classes, *BioTechniques* 44 (2008) 603–610. <https://doi.org/10.2144/000112806>.
- [7] K.K. Kidd, A.J. Pakstis, W.C. Speed, E.L. Grigorenko, S.L.B. Kajuna, N.J. Karoma, S. Kungulilo, J.J. Kim, R.B. Lu, A. Odunsi, F. Okonofua, J. Parnas, L.O. Schulz, O.V. Zhukova, J.R. Kidd, Developing a SNP panel for forensic identification of individuals, *Forensic Science International* 164 (2006) 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.017>.
- [8] FROG-kb, New FROG-kb, (2022). <https://frog.med.yale.edu/FrogKB/index.jsp>.
- [9] K.K. Kidd, The ALlele FREquency Database, *SNP Sets* (2019). <https://alfred.med.yale.edu/alfred/index.asp>.
- [10] K.K. Kidd, J.R. Kidd, W.C. Speed, R. Fang, M.R. Furtado, F.C.L. Hyland, A.J. Pakstis, Expanding data and resources for forensic use of SNPs in individual identification, *Forensic Science International: Genetics* 6 (2012) 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.02.012>.
- [11] A.J. Pakstis, W.C. Speed, R. Fang, F.C.L. Hyland, M.R. Furtado, J.R. Kidd, K.K. Kidd, SNPs for a universal individual identification panel, *Human Genetics* 127 (2010) 315–324. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0771-1>.
- [12] A.J. Pakstis, W.C. Speed, J.R. Kidd, K.K. Kidd, Candidate SNPs for a universal individual identification panel, *Human Genetics* 121 (2007) 305–317. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0342-2>.
- [13] J.J. Sanchez, C. Phillips, C. Børsting, K. Balogh, M. Bogus, M. Fondevila, C.D. Harrison, E. Musgrave-Brown, A. Salas, D. Syndercombe-Court, P.M. Schneider, A. Carracedo, N. Morling, A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification, *Electrophoresis* 27 (2006) 1713–1724. <https://doi.org/10.1002/elps.200500671>.
- [14] M. Fondevila, C. Phillips, C. Santos, R. Pereira, L. Gusmão, A. Carracedo, J.M. Butler, M.V. Lareu, P.M. Vallone, Forensic performance of two insertion-deletion marker assays, *International Journal of Legal Medicine* 126 (2012) 725–737. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0721-7>.
- [15] I. Pietrangeli, E. Ottaviani, C. Martone, L. Gabriele, G. Arcudi, S. Potenza, A. Spinella, E. Giardina, G. Novelli, Frequency assessment of 25 SNPs in five different populations, *Forensic Science International: Genetics* 4 (2010) e131–e133. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.01.017>.
- [16] L.A. Dixon, C.M. Murray, E.J. Archer, A.E. Dobbins, P. Koumi, P. Gill, Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes, *Forensic Science International* 154 (2005) 62–77. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.12.011>.
- [17] R. Pereira, C. Phillips, C. Alves, A. Amorim, Á. Carracedo, L. Gusmao, A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms, *Electrophoresis* 30 (2009) 3682–3690. <https://doi.org/10.1002/elps.200900274>.
- [18] P.M. Vallone, A.E. Decker, J.M. Butler, Allele frequencies for 70 autosomal SNP loci with U.S. Caucasian, African-American, and Hispanic samples, *Forensic Science International* 149 (2005) 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.07.014>.
- [19] B. Budowle, T.R. Moretti, S.J. Niezgodna, B.L. Brown, CODIS and PCR-Based Short Tandem Repeat Loci: Law Enforcement Tools, in: *Second European Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, Innsbruck, Austria, 1998.
- [20] ThermoFisher Scientific, HID SNP Genotyper Plugin, User Guide (2017).
- [21] C. Phillips, R. Fang, D. Ballard, M. Fondevila, C. Harrison, F. Hyland, E. Musgrave-Brown, C. Proff, E. Ramos-Luis, B. Sobrino, A. Carracedo, M.R. Furtado, D.S. Court, P.M. Schneider, Evaluation of the Genplex SNP typing system and a 49plex forensic marker panel, *Forensic Science International: Genetics* 1 (2007) 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.007>.

- [22] VEROGEN, ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit, Datasheet (2018).
- [23] D. Kling, A. Tillmar, Forensic genealogy—A comparison of methods to infer distant relationships based on dense SNP data, *Forensic Science International: Genetics* 42 (2019) 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.06.019>.
- [24] M.D. Coble, R.S. Just, J.E. O’Callaghan, I.H. Letmanyi, C.T. Peterson, J.A. Irwin, T.J. Parsons, Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians, *International Journal of Legal Medicine* 118 (2004) 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0427-6>.
- [25] A. Tillmar, K. Sturk-Andreaggi, J. Daniels-Higginbotham, J.T. Thomas, C. Marshall, The FORCE panel: An all-in-one SNP marker set for confirming investigative genetic genealogy leads and for general forensic applications, *Genes* 12 (2021) 12. <https://doi.org/10.3390/genes12121968>.
- [26] VEROGEN, ForenSeq Kintelligence Kit, Datasheet (2021).
- [27] A. Tillmar, P. Sjölund, B. Lundqvist, T. Klippmark, C. Älgenäs, H. Green, Whole-genome sequencing of human remains to enable genealogy DNA database searches – A case report, *Forensic Science International: Genetics* 46 (2020) 102233. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102233>.
- [28] A. Staadig, A. Tillmar, Evaluation of microhaplotypes in forensic kinship analysis from a Swedish population perspective, *Int J Legal Med* 135 (2021) 1151–1160. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02509-y>.
- [29] T. Frudakis, V. K. M. Thomas, Z. Gaskin, S. Ginjupalli, S. Gunturi, V. Ponnuswamy, S. Natarajan, P. Nachimuthu, A Classifier for the SNP-Based Inference of Ancestry, *Journal of Forensic Sciences* 48 (2003). <https://doi.org/10.1520/jfs2002079>.
- [30] R. Nassir, R. Kosoy, C. Tian, P.A. White, L.M. Butler, G. Silva, R. Kittles, M.E. Alarcon-Riquelme, P.K. Gregersen, J.W. Belmont, F.M. De La Vega, M.F. Seldin, An ancestry informative marker set for determining continental origin: Validation and extension using human genome diversity panels, *BMC Genetics* 10 (2009) 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-39>.
- [31] J.R. Kidd, F.R. Friedlaender, W.C. Speed, A.J. Pakstis, F.M. De La Vega, K.K. Kidd, Analyses of a set of 128 ancestry informative single-nucleotide polymorphisms in a global set of 119 population samples, *Investigative Genetics* 2 (2011). <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-1>.
- [32] C. Phillips, A. Salas, J.J. Sánchez, M. Fondevila, A. Gómez-Tato, J. Álvarez-Dios, M. Calaza, M.C. de Cal, D. Ballard, M.V. Lareu, Á. Carracedo, Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs, *Forensic Science International: Genetics* 1 (2007) 273–280. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2007.06.008>.
- [33] M. Fondevila, C. Phillips, C. Santos, A. Freire Aradas, P.M. Vallone, J.M. Butler, M.V. Lareu, Á. Carracedo, Revision of the SNPforID 34-plex forensic ancestry test: Assay enhancements, standard reference sample genotypes and extended population studies, *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.06.007>.
- [34] K.K. Kidd, W.C. Speed, A.J. Pakstis, M.R. Furtado, R. Fang, A. Madbouly, M. Maiers, M. Middha, F.R. Friedlaender, J.R. Kidd, Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference, *Forensic Science International: Genetics* 10 (2014) 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.002>.
- [35] A.J. Pakstis, E. Haigh, L. Cherni, A.B.A. Elgaaied, A. Barton, B. Evsanaa, A. Togtokh, J. Brissenden, J. Roscoe, O. Bulbul, G. Filoglu, C. Gurkan, K.A. Meiklejohn, J.M. Robertson, C.X. Li, Y.L. Wei, H. Li, U. Soundararajan, H. Rajeevan, J.R. Kidd, K.K. Kidd, 52 additional reference population samples for the 55 AISNP panel, *Forensic Science International: Genetics* 19 (2015) 269–271. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2015.08.003>.
- [36] O. Lao, P.M. Vallone, M.D. Coble, T.M. Diegoli, M. Van Oven, K.J. Van Der Gaag, J. Pijpe, P. De Knijff, M. Kayser, Evaluating self-declared ancestry of U.S. Americans with autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA, *Human Mutation* 31 (2010) E1875. <https://doi.org/10.1002/humu.21366>.
- [37] K.B. Gettings, R. Lai, J.L. Johnson, M.A. Peck, J.A. Hart, H. Gordish-Dressman, M.S. Schanfield, D.S. Podini, A 50-SNP assay for biogeographic ancestry and phenotype prediction in the U.S. population, *Forensic Science International: Genetics* 8 (2014) 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.07.010>.
- [38] O. Bulbul, G. Filoglu, H. Altuncul, A.F. Aradas, Y. Ruiz, M. Fondevila, C. Phillips, Á. Carracedo, A.K. Kriegel, P.M. Schneider, A SNP multiplex for the simultaneous prediction of biogeographic ancestry and pigmentation type, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 3 (2011) e500–e501. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.10.001>.
- [39] C. Phillips, A.F. Aradas, A.K. Kriegel, M. Fondevila, O. Bulbul, C. Santos, F.S. Rech, M.D.P. Carceles, Á. Carracedo, P.M. Schneider, M.V. Lareu, Eurasiaplex: A forensic SNP assay for

- differentiating European and South Asian ancestries, *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.02.010>.
- [40] C.M. Nievergelt, A.X. Maihofer, T. Shekhtman, O. Libiger, X. Wang, K.K. Kidd, J.R. Kidd, Inference of human continental origin and admixture proportions using a highly discriminative ancestry informative 41-SNP panel, *Investigative Genetics* 4 (2013). <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-13>.
- [41] U. Soundararajan, L. Yun, M. Shi, K.K. Kidd, Minimal SNP overlap among multiple panels of ancestry informative markers argues for more international collaboration, *Forensic Science International: Genetics* 23 (2016) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.01.013>.
- [42] Y.L. Wei, L. Wei, L. Zhao, Q.F. Sun, L. Jiang, T. Zhang, H.B. Liu, J.G. Chen, J. Ye, L. Hu, C.X. Li, A single-tube 27-plex SNP assay for estimating individual ancestry and admixture from three continents, *International Journal of Legal Medicine* 130 (2016) 27–37. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1183-5>.
- [43] C.X. Li, A.J. Pakstis, L. Jiang, Y.L. Wei, Q.F. Sun, H. Wu, O. Bulbul, P. Wang, L.L. Kang, J.R. Kidd, K.K. Kidd, A panel of 74 AISNPs: Improved ancestry inference within Eastern Asia, *Forensic Science International: Genetics* 23 (2016) 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.04.002>.
- [44] O. Bulbul, W.C. Speed, C. Gurkan, U. Soundararajan, H. Rajeevan, A.J. Pakstis, K.K. Kidd, Improving ancestry distinctions among Southwest Asian populations, *Forensic Science International: Genetics* 35 (2018) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.010>.
- [45] C. Santos, C. Phillips, M. Fondevila, R. Daniel, R.A.H. Van Oorschot, E.G. Burchard, M.S. Schanfield, L. Souto, J. Uacyisrael, M. Via, Á. Carracedo, M.V. Lareu, Pacifiplex: An ancestry-informative SNP panel centred on Australia and the Pacific region, *Forensic Science International: Genetics* 20 (2016) 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.10.003>.
- [46] M. Eduardoff, T.E. Gross, C. Santos, M. De La Puente, D. Ballard, C. Strobl, C. Børsting, N. Morling, L. Fusco, C. Hussing, B. Egyed, L. Souto, J. Uacyisrael, D. Syndercombe Court, Carracedo, M.V. Lareu, P.M. Schneider, W. Parson, C. Phillips, W. Parson, C. Phillips, Inter-laboratory evaluation of the EUROFORGEN Global ancestry-informative SNP panel by massively parallel sequencing using the Ion PGM™, *Forensic Science International: Genetics* 23 (2016) 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.04.008>.
- [47] C. Phillips, W. Parson, B. Lundsberg, C. Santos, A. Freire-Aradas, M. Torres, M. Eduardoff, C. Børsting, P. Johansen, M. Fondevila, N. Morling, P. Schneider, Á. Carracedo, M.V. Lareu, Building a forensic ancestry panel from the ground up: The EUROFORGEN Global AIM-SNP set, *Forensic Science International: Genetics* 11 (2014) 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.012>.
- [48] C. Santos, C. Phillips, F. Oldoni, J. Amigo, M. Fondevila, R. Pereira, Á. Carracedo, M.V. Lareu, Completion of a worldwide reference panel of samples for an ancestry informative Indel assay, *Forensic Science International: Genetics* 17 (2015) 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.011>.
- [49] P. Paschou, J. Lewis, A. Javed, P. Drineas, Ancestry informative markers for fine-scale individual assignment to worldwide populations, *Journal of Medical Genetics* 47 (2010) 835–847. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.078212>.
- [50] U. Rogalla, E. Rychlicka, M.V. Derenko, B.A. Malyarchuk, T. Grzybowski, Simple and cost-effective 14-loci SNP assay designed for differentiation of European, East Asian and African samples, *Forensic Science International: Genetics* 14 (2014) 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.009>.
- [51] H. Junklewitz, P. Ferrara, L. Beslay, *Clustering and Unsupervised Classification in Forensics: From Theory to Practice*, Publication Office of the European Union, Luxembourg, 2021. <https://doi.org/10.2760/308387>.
- [52] J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155 (2000) 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- [53] S. Walsh, L. Chaitanya, L. Clarisse, L. Wirken, J. Draus-Barini, L. Kovatsi, H. Maeda, T. Ishikawa, T. Sijen, P. De Knijff, W. Branicki, F. Liu, M. Kayser, Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage, *Forensic Science International: Genetics* 9 (2014) 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.006>.
- [54] W. Branicki, F. Liu, K. Van Duijn, J. Draus-Barini, E. Pośpiech, S. Walsh, T. Kupiec, A. Wojas-Pelc, M. Kayser, Model-based prediction of human hair color using DNA variants, *Human Genetics* 129 (2011) 443–454. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0939-8>.
- [55] S. Walsh, F. Liu, K.N. Ballantyne, M. Van Oven, O. Lao, M. Kayser, IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information, *Forensic Science International: Genetics* 5 (2011) 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004>.

- [56] Y. Ruiz, C. Phillips, A. Gomez-Tato, J. Alvarez-Dios, M. Casares De Cal, R. Cruz, O. Maroñas, J. Söchtig, M. Fondevila, M.J. Rodriguez-Cid, Á. Carracedo, M.V. Lareu, Further development of forensic eye color predictive tests, *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.009>.
- [57] L. Chaitanya, K. Breslin, S. Zuñiga, L. Wirken, E. Pośpiech, M. Kukla-Bartoszek, T. Sijen, P. de Knijff, F. Liu, W. Branicki, M. Kayser, S. Walsh, The HRisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation, *Forensic Science International: Genetics* 35 (2018) 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004>.
- [58] C. Xavier, M. de la Puente, A. Mosquera-Miguel, A. Freire-Aradas, V. Kalamara, A. Vidaki, T. E. Gross, A. Revoir, E. Pośpiech, E. Kartasińska, M. Spólnicka, W. Branicki, C. E. Ames, P. M. Schneider, C. Hohoff, M. Kayser, C. Phillips, W. Parson, Development and validation of the VISAGE AmpliSeq basic tool to predict appearance and ancestry from DNA, *Forensic Science International: Genetics* 48 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102336>.
- [59] J. Perkel, SNP genotyping: Six technologies that keyed a revolution, *Nature Methods* 5 (2008) 447–453. <https://doi.org/10.1038/nmeth0508-447>.
- [60] B. Budowle, SNP typing strategies, *Forensic Science International* 146 (2004) S139–S142. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.042>.
- [61] M.S. Zar, A.A. Shahid, M.S. Shahzad, K.J. Shin, H.Y. Lee, S.S. Lee, M. Israr, P. Wiegand, G. Kulstein, Forensic SNP Genotyping with SNaPshot: Development of a Novel In-house SBE Multiplex SNP Assay, *Journal of Forensic Sciences* 63 (2018) 1824–1829. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13783>.
- [62] S. Cho, M.-Y. Kim, J.H. Lee, H.Y. Lee, S.D. Lee, Large-scale identification of human bone remains via SNP microarray analysis with reference SNP database, *Forensic Science International: Genetics* 47 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102293>.
- [63] W. Martin, M. Mentel, The Origin of Mitochondria, *Nature Education* 3 (2010) 58.
- [64] J.W. Taanman, The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1410 (1999) 103–123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3).
- [65] D.C. Wallace, Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1994) 8739–8746.
- [66] S. Lutz, H. Wittig, H.-J. Weisser, J. Heizmann, A. Junge, N. Dimo-Simonin, W. Parson, J. Edelmann, K. Anslinger, S. Jung, C. Augustin, Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions?, *Forensic Science International* 113 (2000) 97–101.
- [67] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, I.G. Young, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290 (1981) 457–465.
- [68] R.M. Andrews, I. Kubacka, P.F. Chinnery, R.N. Lightowlers, D.M. Turnbull, N. Howell, Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nat Genet* 23 (1999) 147–147. <https://doi.org/10.1038/13779>.
- [69] D.M. Behar, M. van Oven, S. Rosset, T. Kivisild, A. Torroni, R. Villems, A “Copernican” Reassessment of the Human Mitochondrial DNA Tree from its Root, *American Journal of Human Genetics* 90 (2012) 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.03.002>.
- [70] H.J. Bandelt, A. Kloss-Brandstätter, M.B. Richards, Y.G. Yao, I. Logan, The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies, *Journal of Human Genetics* 59 (2014) 66–77. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.120>.
- [71] D. Bogenhagen, D.A. Clayton, The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid, *Journal of Biological Chemistry* 249 (1974) 7991–7995. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42063-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42063-2).
- [72] A. Furtwängler, E. Reiter, G.U. Neumann, I. Siebke, N. Steuri, A. Hafner, S. Lösch, N. Anthes, V.J. Schuenemann, J. Krause, Ratio of mitochondrial to nuclear DNA affects contamination estimates in ancient DNA analysis, *Sci Rep* 8 (2018) 14075. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32083-0>.
- [73] D. Higgins, A.B. Rohrlach, J. Kaidonis, G. Townsend, J.J. Austin, Differential Nuclear and Mitochondrial DNA Preservation in Post-Mortem Teeth with Implications for Forensic and Ancient DNA Studies, *PLOS ONE* 10 (2015) e0126935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126935>.
- [74] C.A. Hutchinson, J.E. Newbold, S.S. Potter, M.H. Edgell, Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, *Nature* 251 (1974) 536–538. <https://doi.org/10.1038/251536a0>.

- [75] W.M. Brown, M. George, A.C. Wilson, Rapid evolution of animal mitochondrial DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (1979) 1967–1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>.
- [76] F.M. Yakes, B. Van Houten, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 514–519. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.514>.
- [77] B. Budowle, M.W. Allard, M.R. Wilson, Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair, *Forensic Science International* 126 (2002) 30–33. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00019-1).
- [78] K.E. Bendall, B.C. Sykes, Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region., *American Journal of Human Genetics* 57 (1995) 248.
- [79] B. Budowle, M.W. Allard, M.R. Wilson, R. Chakraborty, Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations, *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 4 (2003) 119–141. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110352>.
- [80] T. Kivisild, Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes, *Investigative Genetics* 6 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13323-015-0022-2>.
- [81] M.R. Wilson, J.A. DiZinno, D. Polansky, J. Replogue, B. Budowle, Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis, *International Journal of Legal Medicine* 108 (1995) 68–74.
- [82] M. Montesino, L. Prieto, Capillary Electrophoresis of Big-Dye Terminator Sequencing Reactions for Human mtDNA Control Region Haplotyping in the Identification of Human Remains, in: A. Alonso (Ed.), *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics*, Humana Press, Hertfordshire, 2012: pp. 267–281.
- [83] O.M. Loreille, J.A. Irwin, Capillary Electrophoresis of Human mtDNA Control Region Sequences from Highly Degraded Samples Using Short mtDNA Amplicons, in: A. Alonso (Ed.), *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics*, Humana Press, Hertfordshire, 2015: pp. 283–299.
- [84] N. Damaso, E.C. Ashe, K.A. Meiklejohn, M.F. Kavlick, J.M. Robertson, Comparison of polymerases used for amplification of mitochondrial DNA from challenging hairs and hairs of various treatments, *Forensic Science International: Genetics* 52 (2021) 102484. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102484>.
- [85] K.D. Eilbert, D.R. Foran, Polymerase Resistance to Polymerase Chain Reaction Inhibitors in Bone, *Journal of Forensic Sciences* 54 (2009) 1001–1007.
- [86] QIAGEN, QIAquick® PCR Purification Kit QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit, Quick-Start Protocol (2018). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=e0fab087-ea52-4c16-b79f-c224bf760c39&lang=en> (accessed May 4, 2019).
- [87] QIAGEN, MinElute® Handbook, (2020). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=8f6b09b2-6dcd-4b55-bb4a-255ede40ca3b&lang=en>.
- [88] Appliedbiosystems, ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup, Quick Reference (2017).
- [89] K.A. Dugan, H.S. Lawrence, D.R. Hares, C.L. Fisher, B. Budowle, An Improved Method for Post-PCR Purification for mtDNA Sequence Analysis, *Journal of Forensic Sciences* 47 (2002) 1–8.
- [90] INVITEK Molecular, MSB® Spin PCRapace, (2021). <https://www.invitek-molecular.com/files/invitek/Manuals/MSB%20Spin%20PCRapace.pdf>.
- [91] F. Sanger, S. Nicklen, R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (1977) 5463–5467.
- [92] O. Santapa, S. Filippini, S. Valente, M.B.R. Cardozo, Analysis of forensic samples in Banco Nacional de Datos Genéticos, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2 (2009) 147–148. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2009.09.023>.
- [93] C.J. Adler, W. Haak, D. Donlon, A. Cooper, Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones, *Journal of Archaeological Science* 38 (2011) 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.010>.
- [94] ThermoFisher, BigDye® Terminator v3.1 and v1.1 Cycle Sequencing Kits, (2017). https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/cms_040026.pdf.
- [95] J. Zschocke, B. Janssen, *Molecular Genetics: Mutation Analysis in the Diagnosis of Metabolic Disorders*, in: N. Blau, D. Marinus, K.M. Gibson (Eds.), *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*, Springer, Heidelberg, 2008: pp. 805–830.
- [96] Promega, ProDye™ Terminator Sequencing System, Technical Manual (2021).
- [97] Applied Biosystems, BigDye® X Terminator™ Purification Kit, User Guide (2020). <https://www.thermofisher.com/document-connect/document->

- connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fcms_042772.pdf (accessed May 4, 2019).
- [98] EdgeBio, Optima DTR 96-Well Plate Kits, Product Summary (2015). <https://directus.biocat.com/uploads/biocat/originals/dfu-optima-dtr-96-well-plate-kits-02179v1-17946-45637-.pdf>.
- [99] V. Bourdon, J. Harris, M. Prinz, E. Shapiro, Optimization of Human mtDNA Control Region Sequencing for Forensic Applications, *Journal of Forensic Sciences* 59 (2014) 1057–1063.
- [100] R.K. Roby, M. Sprouse, N. Phillips, A. Alicea-Centeno, S. Shewale, S. Shore, N. Paul, Mitochondrial Genome Interrogation for Forensic Casework and Research Studies, *Current Protocols in Human Genetics* 81 (2014). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1409s81>.
- [101] T. Tucker, M. Marra, J.M. Friedman, Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine, *Am J Hum Genet* 85 (2009) 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022>.
- [102] D. Qin, Next-generation sequencing and its clinical application, *Cancer Biol Med* 16 (2019) 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>.
- [103] A. Siebold, Back to the Basics: Next-Generation Sequencing 101, (2013). <https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/Next%20Generation%20Sequencing%20101.pdf>.
- [104] V. Verma, A. Gupta, V.K. Chaudhary, Emulsion PCR made easy, *BioTechniques* 69 (2020) 64–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0161>.
- [105] M.J. Álvarez-Cubero, M. Saíz, B. Martínez-García, S.M. Sayalero, C. Entrala, J.A. Lorente, L.J. Martínez-González, Next generation sequencing: an application in forensic sciences?, *Annals of Human Biology* (2017) 1464-5033 (Online). <https://doi.org/10.1080/03014460.2017.1375155>.
- [106] L. Liu, Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, M. Law, Comparison of Next-Generation Sequencing Systems, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (2012) e251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>.
- [107] G.J. Porreca, J. Shendure, G.M. Church, Polony DNA Sequencing, *Current Protocols in Molecular Biology* 76 (2006) 7.8.1-7.8.22. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0708s76>.
- [108] Illumina, Illumina Sequencing Technology, (2010). https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
- [109] J.M. Rothberg, W. Hinz, T.M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J.H. Leamon, K. Johnson, M.J. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J.F. Simons, D. Marran, J.W. Myers, J.F. Davidson, A. Branting, J.R. Nobile, B.P. Puc, D. Light, T.A. Clark, M. Huber, J.T. Branciforte, I.B. Stoner, S.E. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierterstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J.A. Fidanza, E. Namsaraev, K.J. McKernan, A. Williams, G.T. Roth, J. Bustillo, An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing, *Nature* 475 (2011) 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature10242>.
- [110] J.F. Thompson, P.M. Milos, The properties and applications of single-molecule DNA sequencing, *Genome Biology* 12 (2011) 217. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-217>.
- [111] Y. Wang, Y. Zhao, A. Bollas, Y. Wang, K.F. Au, Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications, *Nat Biotechnol* 39 (2021) 1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>.
- [112] Verogen, How Next Generation Sequencing Resolved a Difficult Case, Leading to the First Criminal Conviction of Its Kind, (2020). <https://verogen.com/wp-content/uploads/2020/12/ngs-first-criminal-conviction-case-study-vd2019024-b.pdf>.
- [113] D. Ballard, J. Winkler-Galicki, J. Wesoły, Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects, *Int J Legal Med* 134 (2020) 1291–1303. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02294-0>.
- [114] C. Børsting, N. Morling, Next generation sequencing and its applications in forensic genetics, *Forensic Science International: Genetics* (2015) 78–89.
- [115] C. Haarkötter, M. Saiz, X. Gálvez, M.I. Medina-Lozano, J.C. Álvarez, J.A. Lorente, Usefulness of Microbiome for Forensic Geolocation: A Review, *Life* 2021, Vol. 11, Page 1322 11 (2021) 1322. <https://doi.org/10.3390/LIFE11121322>.
- [116] D.L.T. Apaga, S.E. Dennis, J.M. Salvador, G.C. Calacal, M.C.A. De Ungria, Comparison of Two Massively Parallel Sequencing Platforms using 83 Single Nucleotide Polymorphisms for Human Identification, *Sci Rep* 7 (2017) 398. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00510-3>.
- [117] P.A. Barrio, Ó. García, C. Phillips, L. Prieto, L. Gusmão, C. Fernández, F. Casals, J.M. Freitas, M. del C. González-Albo, P. Martín, A. Mosquera, I. Navarro-Vera, M. Paredes, J.A. Pérez, A. Pinzón, R. Rasal, J. Ruiz-Ramírez, B.R. Trindade, A. Alonso, The first GHEP-ISFG collaborative exercise

- on forensic applications of massively parallel sequencing, *Forensic Science International: Genetics* 49 (2020) 102391. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102391>.
- [118] Verogen, ForenSeq DNA Signature Prep Kit, Reference Guide (2022). <https://verogen.com/wp-content/uploads/2022/01/forenseq-dna-signature-prep-reference-guide-PCR1-vd2018005-d.pdf>.
- [119] Verogen, ForenSeq MainstAY Product Line, Reference Guide (2022). <https://verogen.com/wp-content/uploads/2022/01/forenseq-mainstay-reference-guide-PCR1-vd2020050-c.pdf>.
- [120] Verogen, ForenSeq mtDNA Whole Genome Kit, Reference Guide (2020). <https://verogen.com/wp-content/uploads/2022/06/forenseq-mtdna-whole-genome-kit-reference-guide-vd2020006-b.pdf>.
- [121] Verogen, ForenSeq mtDNA Control Region Kit, Reference Guide (2020). <https://verogen.com/wp-content/uploads/2022/06/forenseq-mtdna-control-region-kit-reference-guide-vd2018024-c.pdf>.
- [122] Verogen, ForenSeq Imagen Kit, Reference Guide (2022). <https://verogen.com/wp-content/uploads/2022/08/forenseq-imagen-reference-guide-PCR1-vd2022008-a.pdf>.
- [123] ThermoFisher, Maximize Forensic Genetic Analysis Potential Using an STR + SNP Combination NGS Workflow, (2019). https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSGS%2FTechnical-Notes%2FPrecision_id_str_snp_combo_2019_technical_note.pdf.
- [124] ThermoFisher Scientific, Ion AmpliSeq Community Panels for Human Identification, (2021). <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/forensics/human-identification/forensic-dna-analysis/dna-analysis/next-generation-sequencing-ngs-forensics/ion-ampliseq-community-panels.html>.
- [125] S. Walsh, F. Liu, A. Wollstein, L. Kovatsi, A. Ralf, A. Kosiniak-Kamysz, W. Branicki, M. Kayser, The HIRISplex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA, *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>.
- [126] M. Diepenbroek, B. Bayer, K. Schwender, R. Schiller, J. Lim, R. Lagacé, K. Anslinger, Evaluation of the Ion AmpliSeq™ PhenoTrivium Panel: MPS-Based Assay for Ancestry and Phenotype Predictions Challenged by Casework Samples, *Genes* 11 (2020) 1398. <https://doi.org/10.3390/genes11121398>.
- [127] A. Ralf, M. van Oven, D.M. González, P. de Knijff, K. van der Beek, S. Wootton, R. Lagacé, M. Kayser, Forensic Y-SNP analysis beyond SNaPshot: High-resolution Y-chromosomal haplogrouping from low quality and quantity DNA using Ion AmpliSeq and targeted massively parallel sequencing, *Forensic Science International: Genetics* 41 (2019) 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.04.001>.
- [128] F. Oldoni, D. Bader, C. Fantinato, S.C. Wootton, R. Lagacé, K.K. Kidd, D. Podini, A sequence-based 74plex microhaplotype assay for analysis of forensic DNA mixtures, *Forensic Science International: Genetics* 49 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102367>.
- [129] Promega, PowerSeq® 46GY System, Technical Manual (2022). <https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/powerseq-46gy-system-protocol-tm522.pdf?rev=b506e6276bee4c52b78f3f9a1b5e70be&la=en>.
- [130] Promega, Massively Parallel Sequencing of Mitochondrial Control Region using the PowerSeq® CRM Nested System, Custom, Application Note #AN322 (2021). <https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/custom-systems/an322-powerseq-crm-system-custom.pdf?rev=8f44dc96574f449281b7b2459e7d39e8&la=en>.
- [131] QIAGEN, Massively Parallel Sequencing Solutions for Human Identity, (2020). <https://www.qiagen.com/nl/resources/download.aspx?id=0911339c-77bb-4ba9-8dd6-60bba6be0d74&lang=en>.
- [132] K. Elwick, M.M. Bus, J.L. King, J. Chang, S. Hughes-Stamm, B. Budowle, Utility of the Ion S5™ and MiSeq FGx™ sequencing platforms to characterize challenging human remains, *Legal Medicine* 41 (2019) 101623. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2019.08.001>.
- [133] C. Finaughty, K.M. Reid, I.H. Alli, L.J. Heathfield, A first for forensic genetics in Africa: successful identification of skeletal remains from the marine environment using massively parallel sequencing, *Forensic Science International: Genetics* 49 (2020) 102370. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102370>.
- [134] A. Alonso, P. Müller, L. Roewer, S. Willuweit, B. Budowle, W. Parson, European survey on forensic applications of massively parallel sequencing, *Forensic Science International: Genetics* 29 (2017) e23–e25. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.017>.
- [135] P. de Knijff, From next generation sequencing to now generation sequencing in forensics, *Forensic Science International: Genetics* 38 (2019) 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.017>.
- [136] M. Hofreiter, J. Sneiderger, M. Pospisek, D. Vanek, Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA, *Forensic Science International: Genetics* 54 (2021) 102538. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102538>.

- [137] M. Hofreiter, J.L.A. Paijmans, H. Goodchild, C.F. Speller, A. Barlow, G.G. Fortes, J.A. Thomas, A. Ludwig, M.J. Collins, The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts: Prospects & Overviews, *BioEssays* 37 (2015) 284–293. <https://doi.org/10.1002/bies.201400160>.
- [138] L. Orlando, R. Allaby, P. Skoglund, C. Der Sarkissian, P.W. Stockhammer, M.C. Ávila-Arcos, Q. Fu, J. Krause, E. Willerslev, A.C. Stone, C. Warinner, Ancient DNA analysis, *Nat Rev Methods Primers* 1 (2021) 14. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>.
- [139] E.A. Bennett, D. Massilani, G. Lizzo, J. Daligault, E.-M. Geigl, T. Grange, Library construction for ancient genomics: Single strand or double strand?, *BioTechniques* 56 (2014) 289–300. <https://doi.org/10.2144/000114176>.
- [140] C. Carøe, S. Gopalakrishnan, L. Vinner, S.S.T. Mak, M.H.S. Sinding, J.A. Samaniego, N. Wales, T. Sicheritz-Pontén, M.T.P. Gilbert, Single-tube library preparation for degraded DNA, *Methods Ecol Evol* 9 (2018) 410–419. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12871>.
- [141] M.-T. Gansauge, T. Gerber, I. Glocke, P. Korlević, L. Lippik, S. Nagel, L.M. Riehl, A. Schmidt, M. Meyer, Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase, *Nucleic Acids Res* (2017) gkx033. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx033>.
- [142] C.J. Troll, J. Kapp, V. Rao, K.M. Harkins, C. Cole, C. Naughton, J.M. Morgan, B. Shapiro, R.E. Green, A ligation-based single-stranded library preparation method to analyze cell-free DNA and synthetic oligos, *BMC Genomics* 20 (2019) 1023. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6355-0>.
- [143] J.D. Kapp, R.E. Green, B. Shapiro, A Fast and Efficient Single-stranded Genomic Library Preparation Method Optimized for Ancient DNA, *Journal of Heredity* 112 (2021) 241–249. <https://doi.org/10.1093/jhered/esab012>.
- [144] N. Rohland, E. Harney, S. Mallick, S. Nordenfelt, D. Reich, Partial uracil–DNA–glycosylase treatment for screening of ancient DNA, *Phil. Trans. R. Soc. B* 370 (2015) 20130624. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0624>.
- [145] A.W. Briggs, U. Stenzel, M. Meyer, J. Krause, M. Kircher, S. Pääbo, Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA, *Nucleic Acids Research* 38 (2010) e87–e87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1163>.
- [146] K. Hölz, A. Pavlic, J. Lietard, M.M. Somoza, Specificity and Efficiency of the Uracil DNA Glycosylase-Mediated Strand Cleavage Surveyed on Large Sequence Libraries, *Sci Rep* 9 (2019) 17822. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54044-x>.
- [147] P.W. Doetsch, G.L. Chan, W.A. Haseltine, T4 DNA polymerase (3′–5′) exonuclease, an enzyme for the detection and quantitation of stable DNA lesions: the ultraviolet light example, *Nucl Acids Res* 13 (1985) 3285–3304. <https://doi.org/10.1093/nar/13.9.3285>.
- [148] F. Jia, X. Lu, X. Tan, D. Wang, X. Cao, K. Zhang, Effect of PEG Architecture on the Hybridization Thermodynamics and Protein Accessibility of PEGylated Oligonucleotides, *Angew Chem Int Ed* 56 (2017) 1239–1243. <https://doi.org/10.1002/anie.201610753>.
- [149] I. Oscorbin, M. Filipenko, Bst polymerase — a humble relative of Taq polymerase, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 21 (2023) 4519–4535. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.09.008>.
- [150] B.K. Peterson, J.N. Weber, E.H. Kay, H.S. Fisher, H.E. Hoekstra, Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species, *PLoS ONE* 7 (2012) e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>.
- [151] N. Rohland, M. Hofreiter, Comparison and optimization of ancient DNA extraction, *BioTechniques* 42 (2007) 343–352. <https://doi.org/10.2144/000112383>.
- [152] R. Brzobohatá, K., Drozdová, E., Smutný, J., Zeman, T., & Beňuš, Comparison of Suitability of the Most Common Ancient DNA Quantification Methods, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 21 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0197>.
- [153] Agilent Technologies, Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide, (2009) 1–4.
- [154] Agilent, Agilent DNF-474 HS NGS Fragment Kit Quick Guide for Fragment Analyzer Systems, (2020).
- [155] H.N. Poinar, C. Schwarz, J. Qi, B. Shapiro, R.D.E. MacPhee, B. Buigues, A. Tikhonov, D.H. Huson, L.P. Tomsho, A. Auch, M. Rampp, W. Miller, S.C. Schuster, Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA, *Science* 311 (2006) 392–394. <https://doi.org/10.1126/science.1123360>.
- [156] R.E. Green, J. Krause, S.E. Ptak, A.W. Briggs, M.T. Ronan, J.F. Simons, L. Du, M. Egholm, J.M. Rothberg, M. Paunovic, S. Pääbo, Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA, *Nature* 444 (2006) 330–336. <https://doi.org/10.1038/nature05336>.
- [157] A.M. Giani, G.R. Gallo, L. Gianfranceschi, G. Formenti, Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly, *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18 (2020) 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.002>.

- [158] M. Knapp, M. Hofreiter, Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives, *Genes* 1 (2010) 227–243. <https://doi.org/10.3390/genes1020227>.
- [159] P. Skoglund, B.H. Northoff, M.V. Shunkov, A.P. Derevianko, S. Pääbo, J. Krause, M. Jakobsson, Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 2229–2234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318934111>.
- [160] K. Prüfer, U. Stenzel, M. Hofreiter, S. Pääbo, J. Kelso, R.E. Green, Computational challenges in the analysis of ancient DNA, *Genome Biology* 11 (2010) R47. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-r47>.
- [161] C. Gasc, E. Peyretaillade, P. Peyret, Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms, *Nucleic Acids Res* 44 (2016) 4504–4518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw309>.
- [162] Q. Fu, M. Hajdinjak, O.T. Moldovan, S. Constantin, S. Mallick, P. Skoglund, N. Patterson, N. Rohland, I. Lazaridis, B. Nickel, B. Viola, K. Prüfer, M. Meyer, J. Kelso, D. Reich, S. Pääbo, An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor, *Nature* 524 (2015) 216–219. <https://doi.org/10.1038/nature14558>.
- [163] Arbor biosciences, myBaits Expert Human Affinities. A genome-wide SNP kit for ancient human population genetics, (2023). <https://arborbiosci.com/products/targeted-ngs/mybaits-predesigned-kits/mybaits-expert-predesigned-panels/mybaits-expert-human-affinities/>.
- [164] Twist, Twist Target Enrichment Standard Hybridization v2 Protocol, (2022). https://www.twistbioscience.com/sites/default/files/resources/2022-04/Protocol_NGS_TargetEnrichmentStandardHyb_V2Protocol_12APR22_Rev3.0.pdf.
- [165] N. Rohland, S. Mallick, M. Mah, R. Maier, N. Patterson, D. Reich, Three assays for in-solution enrichment of ancient human DNA at more than a million SNPs, *Genome Res.* 32 (2022) 2068–2078. <https://doi.org/10.1101/gr.276728.122>.
- [166] S. Horn, Target Enrichment via DNA Hybridization Capture, in: B. Shapiro, M. Hofreiter (Eds.), *Ancient DNA*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012: pp. 177–188. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-516-9_21.
- [167] J. Wang, B. McCord, The application of magnetic bead hybridization for the recovery and STR amplification of degraded and inhibited forensic DNA, *Electrophoresis* 32 (2011) 1631–1638. <https://doi.org/10.1002/elps.201000694>.
- [168] B. Bekaert, R. Ellerington, L. Van Den Abbeele, R. Decorte, In-Solution Hybridization for the Targeted Enrichment of the Whole Mitochondrial Genome, in: W. Goodwin (Ed.), *Forensic DNA Typing Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2016: pp. 173–183. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_14.
- [169] J.M. Young, D. Higgins, J.J. Austin, Hybridization Enrichment to Improve Forensic Mitochondrial DNA Analysis of Highly Degraded Human Remains, *Front. Ecol. Evol.* 7 (2019) 450. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00450>.
- [170] F. Bardan, D. Higgins, J.J. Austin, A custom hybridisation enrichment forensic intelligence panel to infer biogeographic ancestry, hair and eye colour, and Y chromosome lineage, *Forensic Science International: Genetics* 63 (2023) 102822. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102822>.
- [171] N. Bose, K. Carlberg, G. Sensabaugh, H. Erlich, C. Calloway, Target capture enrichment of nuclear SNP markers for massively parallel sequencing of degraded and mixed samples, *Forensic Science International: Genetics* 34 (2018) 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.010>.
- [172] E.M. Gorden, K. Sturk-Andreaggi, C. Marshall, Capture enrichment and massively parallel sequencing for human identification, *Forensic Science International: Genetics* 53 (2021) 102496. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102496>.
- [173] M. Schubert, A. Ginolhac, S. Lindgreen, J.F. Thompson, K.A. AL-Rasheid, E. Willerslev, A. Krogh, L. Orlando, Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes, *BMC Genomics* 13 (2012) 178. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-178>.
- [174] C.V. Ramamoorthy, H.F. Li, Pipeline Architecture, *ACM Comput. Surv.* 9 (1977) 61–102. <https://doi.org/10.1145/356683.356687>.
- [175] J.A. Fellows Yates, T.C. Lamnidis, M. Borry, A. Andrades Valtueña, Z. Fagernäs, S. Clayton, M.U. Garcia, J. Neukamm, A. Peltzer, Reproducible, portable, and efficient ancient genome reconstruction with nf-core/eager, *PeerJ* 9 (2021) e10947. <https://doi.org/10.7717/peerj.10947>.
- [176] H.N. Poinar, The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples, *International Congress Series* 1239 1239 (2003) 575–579.
- [177] C. Haarkötter, X. Gálvez, D.C. Vinuesa-Espinosa, M.I. Medina-Lozano, M. Saiz, J.A. Lorente, J.C. Álvarez, A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains, *Forensic Science International* 348 (2023) 111730. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111730>.

- [178] Thermo Fisher Scientific, Quantifiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits, User Guide (2018). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4485354.pdf> (accessed July 29, 2021).
- [179] ThermoFisher Scientific, GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits, User Guide (2019). <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4477604.pdf>.
- [180] M. Meyer, M. Kircher, Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing, Cold Spring Harb Protoc 2010 (2010) pdb.prot5448. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5448>.
- [181] A. Oliva, R. Tobler, A. Cooper, B. Llamas, Y. Souilmi, Systematic benchmark of ancient DNA read mapping, Briefings in Bioinformatics 22 (2021) bbab076. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab076>.
- [182] J. Neukamm, A. Peltzer, K. Nieselt, DamageProfiler: fast damage pattern calculation for ancient DNA, Bioinformatics 37 (2021) 3652–3653. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab190>.
- [183] A. Piovesan, M.C. Pelleri, F. Antonaros, P. Strippoli, M. Caracausi, L. Vitale, On the length, weight and GC content of the human genome, BMC Res Notes 12 (2019) 106. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4137-z>.
- [184] E.I. Zavala, J.T. Thomas, K. Sturk-Andreaggi, J. Daniels-Higginbotham, K.K. Meyers, S. Barrit-Ross, A. Aximu-Petri, J. Richter, B. Nickel, G.E. Berg, T.P. McMahon, M. Meyer, C. Marshall, Ancient DNA Methods Improve Forensic DNA Profiling of Korean War and World War II Unknowns, Genes 13 (2022) 129. <https://doi.org/10.3390/genes13010129>.

Capítulo 6. Visualización de resultados



Es, lo admito, pura imaginación, ¿pero cuántas veces es la imaginación la madre de la verdad?

Sherlock Holmes, El valle del terror.

Resumen: El presente capítulo tiene el objetivo de hacer una revisión de los principales métodos de separación y detección de ADN, con especial hincapié en los analizadores genéticos. A continuación, tras unas nociones sobre el análisis de datos, se desarrolla la sistemática para la interpretación de perfiles en muestras críticas, así como los cálculos estadísticos pertinentes en caso de una identificación.

Palabras clave: Analizador genético; Electroforesis capilar; Estadística; GeneMapper; Perfil genético.

Abstract: This chapter aims to review the main methods of DNA separation and detection, with a particular emphasis on genetic analyzers. Following an overview of data analysis, critical remains genetic data analysis criteria is explained, along with the relevant statistical calculations in the event of an identification.

Keywords: Capillary electrophoresis; Genetic analyzer; Statistics; GeneMapper; Genetic profile

1. Introducción

Una vez se han amplificado los fragmentos de ADN (o se ha realizado la reacción de secuenciación correspondiente) surge el problema técnico de su visualización, pues tendremos una mezcla de fragmentos de varios tamaños en los que puede surgir la necesidad de una resolución de un único par de bases para conseguir la separación de los alelos. Esto se consigue mediante la aplicación de una técnica de separación y de detección de ADN, lo que se consigue mediante la electroforesis [1].

La electroforesis es una técnica de separación en la que las moléculas de ADN (independientemente del tamaño tendrán la misma relación carga/masa) se separan al aplicar un campo eléctrico en un medio poroso [2], visualizándose los fragmentos por distintos métodos: rayos X, tinción de plata, quimioluminiscencia, entre otros.

El ADN, recordemos, se compone de una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato, que con un pK_a cercano a 0 se encuentran completamente ionizados y con carga negativa a pH 7 [3].

En el presente capítulo estudiaremos las fases finales del análisis forense de ADN: la visualización de resultados y los correspondientes cálculos estadísticos.

2. Métodos para la separación de ADN

2.1. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel (de agarosa o de poli(acrilamida), véase la **Figura 1**) es una de las técnicas más utilizadas para la separación, identificación y purificación de ácidos nucleicos, con una capacidad de resolución de hasta el 0,2% de variación en tamaño entre fragmentos. Los geles de agarosa son los más utilizados por ser más sencillos de preparar, mientras que los geles de acrilamida, pese a que su preparación es más compleja, tienen un mayor poder de resolución [4].

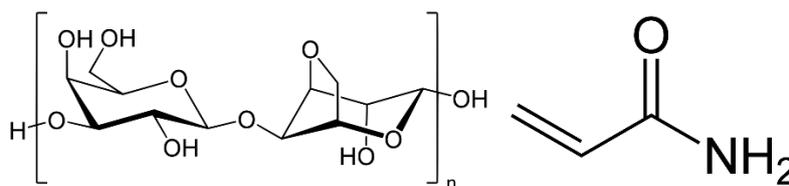


Figura 1. Moléculas de agarosa (izquierda) y acrilamida (derecha)

En las primeras aplicaciones forenses del ADN no codificante se utilizaba un gel de agarosa al 1% para separar fragmentos de entre 1000 y 3000 pares de bases [5].

2.2. Electroforesis capilar

La búsqueda de una mayor eficiencia a la hora de separar moléculas (mayor poder de resolución) llevó a probar con alterar los diferentes parámetros de la electroforesis, como es el voltaje aplicado. Sin embargo, la subida del mismo llevaba aparejada un aumento de la temperatura, lo

que en 1981 se solucionó con el desarrollo de la electroforesis en un capilar de 75 μm , desarrollándose así la electroforesis capilar [6]. No fue hasta 1995 cuando, como veremos, se implementó en Genética forense.

3. Métodos de detección de ADN

3.1. Autorradiografía

La autorradiografía es una técnica en la que una molécula (en nuestro caso el ADN) se marca radiactivamente y se pone en contacto con una emulsión fotográfica especial, de manera que los átomos radiactivos al descomponerse emiten radiación que alterará los granos de plata de la emulsión, utilizándose para ello radiación β o rayos X [7].

3.2. Tinción de plata

Aunque primeramente se desarrolló para la detección de proteínas, la tinción de plata se optimizó para otras biomoléculas como el ADN. La necesidad de un protocolo que permitiera visualizar y resolver perfiles de ADN complejos llevó a la combinación de la electroforesis en geles de poliacrilamida con la tinción de plata para detectar el ADN, produciéndose incluso kits comerciales como GenePrint STR systems o SILVER SEQUENCE de Promega Corporation, y es que este método de detección presenta ventajas como la visualización del gel bajo luz ambiente normal, la gran sensibilidad (la plata se deposita sobre las moléculas de ADN), no presenta peligrosidad como los rayos X, y los geles revelados se podían secar y conservar durante mucho tiempo [8].

Después de aplicar a la muestra diversos reactivos como ácido acético, etanol, y dicromato de potasio, se añade nitrato de plata (AgNO_3), que interacciona con el fosfato del ADN dando fosfato de plata (Ag_3PO_4). Aplicando carbonato de sodio y ácido acético se forma plata sólida (Ag), de color negro, por una reacción redox [9].

3.3. Fluorescencia

Uno de los métodos para la visualización del ADN es la utilización de un agente intercalante, como el bromuro de etidio o el SYBR, que se une al ADN para su posterior visualización en un transiluminador con luz ultravioleta [10].

La búsqueda de un método automatizado y no peligroso de detección de ADN desembocó en el desarrollo de unas sondas que llevaban unidas por enlace covalente una sustancia denominada fluoróforo, que excita bajo la incidencia de un láser, emitiendo luz, como son la fluoresceína, el NBD (nitrobenzoxadiazoleno), tetrametilrodamina o el rojo Texas [11].

Desde entonces se han desarrollado diferentes fluoróforos para la detección de ADN en el campo forense: 5-FAMTM, 6-FAM, JOETM, NEDTM, ROXTM, VICTM, PET o LIZTM [12]. El hecho de trabajar con espectros de absorción y emisión implica la utilización de un detector, utilizándose

para ello una cámara CCD o dispositivo de carga acoplada, que detecta la luz mediante semiconductores [13].

Los fluorocromos son sustancias químicas que absorben radiación lumínica de una longitud de onda determinada (espectro de absorción) y la liberan en otra longitud de onda (espectro de emisión), de manera que los fluoróforos ideales en un ensayo son aquellos que absorben en una longitud de onda muy similar pero que las emisiones son fuertes y de diferentes longitudes de onda; [14] estos fluorocromos pueden estar unidos a nucleótidos o a cebadores.

4. Analizadores genéticos

Los primeros trabajos con electroforesis capilar y STRs utilizaban instrumentos con detección por luz ultravioleta o por excitación de un fluoróforo de un único color, debiendo añadirse a la carrera unos marcadores de tamaño (*size standard*) y las diferentes variantes alélicas (*allelic ladder*). En julio de 1995 un dispositivo lo cambió todo: el analizador genético ABI PRISM 310 con detección de fluorescencia multicolor y 30 minutos de carrera por muestra supuso una revolución para el análisis de STRs [15].

4.1. Componentes de un analizador genético

Un analizador genético consta de una fuente de hasta 20.000 voltios y dos electrodos de platino sumergidos en dos tampones y conectados a la fuente (ánodo, de carga negativa, y cátodo, de carga positiva), un capilar, un láser y una cámara CCD, como se muestra en la **Figura 2**.

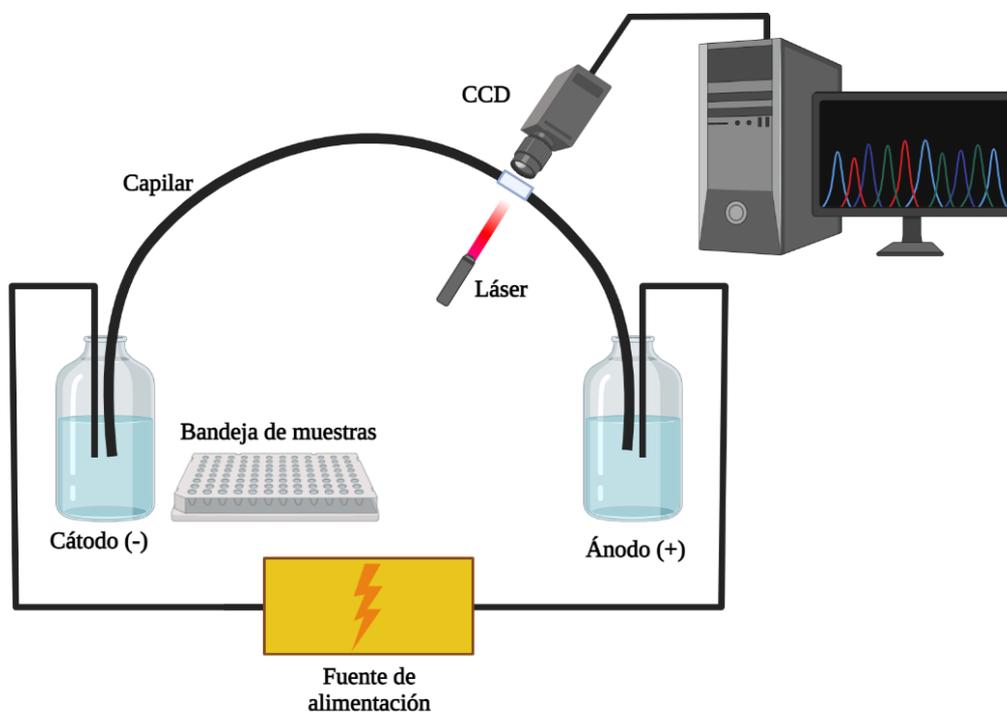


Figura 2. Esquema de la electroforesis capilar. Editado con Biorender

Especial mención requiere la inyección de la muestra, que puede hacerse de dos maneras: hidrodinámica, en la que la muestra se succiona aplicando un gradiente de presión para que pase por el capilar, o electrocinética, la utilizada en analizadores genéticos de identificación humana, en la que se aplica una corriente eléctrica y los analitos con carga (como el ADN) pasan por el capilar [16], permaneciendo por tanto el volumen del pocillo sin alterar.

4.2. Instrumentos

Desde el lanzamiento del primer analizador genético de Applied Biosystems se han ido sucediendo varios instrumentos, mejorando sobre todo en el número de capilares (lo que se traduce en el número de muestras que pueden analizarse diariamente), y el número de canales (lo que implica un mayor número de amplicones en el caso del análisis de fragmentos). En la **Tabla 1** puede verse un resumen de los diferentes modelos que han estado disponibles en el mercado.

Tabla 1. Instrumentos de electroforesis capilar [17–19]

Característica	ABI 310	ABI 3100	ABI 3130	ABI 3730	ABI 3500	Spectrum Compact CE System	Spectrum CE System
Año de salida	1995	2000	2003	2005	2010	2020	2022
Número de capilares	1	4 ó 16	4 ó 16	48 ó 96	8 ó 24	4	8
Longitud array para fragmentos (cm)	36	36	36	36	36	36	36
Longitud array para secuenciación (cm)	50	50	50	50	50	36	-
Polímero para análisis de fragmentos	POP-4™	POP-4™	POP-4™	POP-4™	POP-4™	Polymer4	Polymer4
Polímero para secuenciación	POP-6™	POP-6™	POP-6™ POP-7™	POP-7™	POP-6™ POP-7™	Polymer7	-
Resolución (bases)	1 en fragmentos ≤250	1 en fragmentos ≤400	1	1			
Láser (nm)	488 514.5	488 514.5	488 514.5	488 514.5	505	505	505
Canales (colores)	5	5	5	5	6	6	8
Voltaje electroforesis (kV)	0,1-150	≤20	≤20	≤20	≤20	≤18	≤20
Temperatura del horno (°C)	25-60	18-65	18-65	18-70	18-70	45-70	45-70

4.3. Parámetros de la carrera

A la hora de configurar una carrera son varios los parámetros a tener en cuenta. Éstos normalmente vendrán especificados en la guía del kit de amplificación/secuenciación que se esté utilizando, y son [20]:

- a) *Temperatura del horno (°C)*: temperatura a la que estará el horno principal durante la carrera.
- b) *Voltaje de la carrera (kV)*: diferencia de potencial a la que se realiza la electroforesis.
- c) *Voltaje pre-carrera (kV)*: diferencia de potencial aplicado antes de la inyección.
- d) *Voltaje de inyección (kV)*: diferencia de potencial aplicado durante la inyección.
- e) *Tiempo de carrera (s)*: intervalo en el que se recopilan datos después de alcanzar el voltaje de carrera.
- f) *Tiempo de pre-carrera (s)*: diferencia de potencial aplicado intervalo en el que se aplica la diferencia de potencial antes de la inyección de las muestras.
- g) *Tiempo de inyección (s)*: intervalo en el que se inyecta la muestra.

Cabe preguntarse si pueden modificarse estos parámetros para conseguir mejores resultados en muestras difíciles. A este respecto, un estudio modifica el tiempo y el voltaje de inyección para conseguir mejores perfiles en ADN de bajo número de copias, obteniendo en los marcadores un mejor balance de heterocigosidad, más intensidad de fluorescencia, y menor número de *drop-out* aumentando tanto el voltaje como el tiempo de inyección [21]. Otro estudio encuentra todavía más mejoras si aumenta 1-2 ciclos de PCR y de 5 a 20 segundos el tiempo de inyección [22], aunque esta combinación se ha recomendado para, únicamente, muestras con muy poca cantidad de ADN [23]. Finalmente, parece ser que los kits más actuales, comparados con sus predecesores de menos canales, no mejoran gran cosa cuando se modifican los parámetros de inyección [24]. Otra opción que parece hacer ganar en sensibilidad es modificar la cantidad de estándar que se pone en el pocillo: una reducción de la misma aumentó el número de alelos detectados [25].

Debe observarse que cualquier cambio en el tiempo de inyección debe conllevar un cambio proporcional en los parámetros de normalización de los picos [20].

5. Análisis de datos

Una vez hecha la carrera se procede al análisis de datos, siendo el software más utilizado el GeneMapper® ID-X, especialmente diseñado para aplicaciones de identificación humana, aunque hay alternativas como GeneMarker®HID Software for Spectrum CE Systems (Promega Corporation). Estos programas informáticos realizan las siguientes operaciones [26]:

- 1) Detección de los picos detectados por el analizador genético.
- 2) *Sizing*. Se comparan los picos obtenidos con el estándar de tamaño y se les asigna un determinado tamaño en pares de bases.
- 3) *Genotyping*. Se comparan los picos obtenidos con la escalera alélica (*ladder*), asignando a cada pico un alelo.
- 4) Electroferograma. Se obtiene el electroferograma final con sus indicadores de calidad.

En este punto del análisis de ADN de restos óseos críticos deben tenerse en cuenta diversos parámetros que nos hablarán de la calidad del perfil genético obtenido [27] (**Figura 3**):

- 1) *Umbral analítico*. Constituye el requisito mínimo de altura de un pico para ser distinguido del ruido de fondo. Un umbral analítico muy bajo conlleva la detección de alelos espurios, mientras que con un umbral analítico muy alto pueden perderse alelos, por lo que es importante que cada laboratorio lo determine validando su propio instrumento (lo que incluye electroforesis de reactivos y controles positivos y negativos).
- 2) *Umbral estocástico*. La amplificación de muestras con bajo número de copias puede conllevar efectos estocásticos, en los que un marcador heterocigoto tiene un balance de heterocigosidad de menos del 60%, o incluso únicamente se amplifica uno de ellos; el umbral estocástico es la altura de picos por debajo de la cual no se puede descartar pérdidas alélicas (*dropout*). Al igual que el umbral analítico, se determina por cada laboratorio siguiendo una validación.
- 3) *Peak Height Ratio (PHR)*. La ratio de altura de picos mide la proporción entre los dos alelos de un mismo marcador, calculándose como la relación entre el alelo más pequeño y el alelo más grande, obteniéndose un número entre 0 y 1: se considera un balance adecuado a partir de 0,6 (60%).

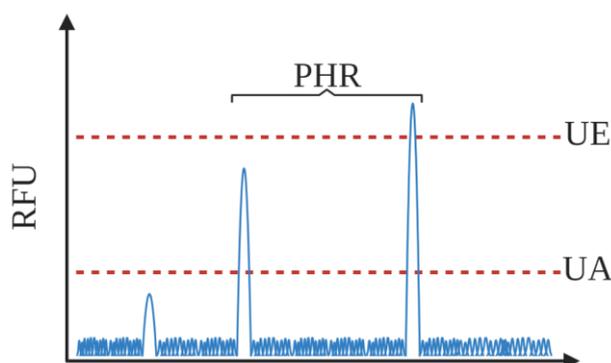


Figura 3. Umbral analítico (UA), Umbral estocástico (UE) y *Peak Height Ratio* (PHR). Editado con Biorender

6. Interpretación de perfiles de restos óseos críticos

A partir de la muerte del organismo acontece un conjunto de reacciones químicas enzimáticas (endonucleasas) y no enzimáticas (reacciones hidrolíticas, entrecruzamiento, reacciones oxidativas y radiación) en el ADN que van a desembocar en el momento de la PCR en fallo de la amplificación, amplificación preferencial de un alelo, incorporación errónea de nucleótidos, amplicones que actúan como cebadores, e inhibición de la PCR [28]. Es por esto que, a la hora de interpretar los perfiles de restos óseos degradados, debemos tener en cuenta las recomendaciones para ADN de bajo número de copias, así como ADN degradado, ateniéndonos a la obtención de un perfil de tipo pista de esquí (*ski-slope*) y el método consenso [29].

El perfil *ski-slope* es un parámetro cualitativo que nos informa de la degradación de la muestra, y por ende es un indicador de que se ha amplificado ADN endógeno y no exógeno, consistiendo en una amplificación preferencial de los marcadores de menor tamaño frente a aquellos de mayor peso molecular [30]. A esto se añade la probabilidad de *drop out*, inversamente proporcional a la altura de los picos, siendo, por ejemplo, de 0.0001 con 500 RFU, pero de 0.7000 con 50 [31]. Esta probabilidad se ve aumentada, como es natural, si las muestras están degradadas [32].

Trabajando con ADN de bajo número de copias hay que tener en cuenta que el control negativo de extracción detecta únicamente contaminación en los reactivos, observándose los mismos alelos espurios (si se obtienen) en la muestra, cosa que no sucede cuando se trabaja con este tipo de muestras por su sensibilidad, pudiendo presentarse contaminación en las muestras que no se ha detectado en los controles negativos; por otra parte, se aconseja el trabajo con réplicas, pues es estadísticamente muy improbable encontrar los mismos alelos espurios en dos alícuotas [33].

Teniendo en cuenta toda esta problemática se ha desarrollado el método de consenso, que confirma los alelos de un genotipo mediante su repetición en diferentes réplicas; no obstante, se plantea la cuestión de si se tienen en cuenta todos los alelos detectados (método compuesto), todos los alelos repetidos en $n-1$ réplicas (método $n-1$), todos los alelos repetidos en la mitad de las réplicas (método $n/2$), o sólo los alelos detectados dos veces (método $2x$), a este respecto se han formulado las siguientes recomendaciones [34]:

- 1) El mejor método de consenso es $n/2$: se contabilizarán los alelos detectados en, al menos, la mitad de las réplicas (los otros pueden conllevar exclusiones falsas o identificaciones adventicias).
- 2) Cuando se detecten más del 25% de los alelos se utilizarán 3 réplicas; cuando se detecten menos se utilizarán 4 réplicas (no se obtiene mucha más información con un número mayor).
- 3) Las réplicas obtenidas con una metodología diferente se pueden incluir en el perfil consenso siempre y cuando sean de amplificaciones diferentes.

Sobre la cuestión de si las alícuotas parten del extracto de ADN o si deben ser extractos diferentes, un estudio demostró una mayor efectividad (mayor cantidad de marcadores recuperados) si la amplificación se hace en una sola reacción, es decir, de un mismo extracto [35].

Además, se deben tener en cuenta otras recomendaciones a la hora de trabajar con este tipo de muestras, y es la de contrastar todos los resultados obtenidos con el perfil genético del personal del laboratorio [36].

7. Cálculos estadísticos

El fundamento matemático de todos los cálculos que vamos a ver a continuación es el teorema de Bayes, la relación entre probabilidad no condicionadas y probabilidades condicionadas (en un

dado, por ejemplo, obtener un número primo y que sea mayor que 3), que viene dada por la siguiente ecuación [37]:

$$\Pr(B|A) = \frac{\Pr(B) \cdot \Pr(A|B)}{\Pr(A)}$$

Cuando en un cotejo se obtiene una coincidencia se da un resultado estadístico que informa de la rareza de ese genotipo en la población general, de manera que cuanto menos frecuente sea mayor fuerza tendrá la hipótesis de la relación biológica entre las muestras dubitada y de referencia; este valor se denomina *likelihood ratio* o LR, que es la ratio de la probabilidad de que los individuos de esas muestras tengan una relación de familiaridad concreta, frente a que no estén relacionados; cuanto mayor sea este valor, mayor será el soporte de la hipótesis de familiaridad que se plantee [38].

A este respecto debemos recordar que el número de alelos que dos familiares comparten depende de la relación de familiaridad, en lo que se denomina coeficientes de relación de familiaridad (k), los mostrados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Valores de los coeficientes de familiaridad (k) según la relación de familiaridad [39]

Relación	Probabilidad de heredar ambos alelos (k ₂)	Probabilidad de heredar sólo uno de los dos alelos (2k ₁)	Probabilidad de heredar un alelo cualquiera de los dos (k ₁)	Probabilidad de no compartir ningún alelo (k ₀)
Padre/madre-hijo	0	1	1/2	0
Hermandad	1/4	1/2	1/4	1/4
Medio hermandad	0	1/2	1/4	1/2
Abuelo-nieto	0	1/2	1/4	1/2
Tío-sobrino	0	1/2	1/4	1/2
Primos	0	1/4	3/25	3/4
Primos segundos	0	3/50	3/100	47/50

La base de datos poblacional se obtiene analizando el ADN del grupo poblacional con el que se vaya a trabajar, estableciéndose un mínimo de 100-150 individuos por población, lo que permite una estimación conservadora para con los alelos menos frecuentes [40]. Si en las muestras se observan alelos que no están en la base de datos poblacional, para calcular el LR se utilizará el resultado de la expresión $\frac{5}{2n}$ siendo n el número de individuos de la base de datos [41]. A este respecto hay disponible una base de datos colaborativa: STRs for Identity ENFSI Reference Database (STRidER) [42], así como su homóloga norteamericana, la Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase (STRBASE) [43]. Para el cálculo de los parámetros estadísticos de la base de

datos hay asimismo disponibles herramientas como STRAF (STR Analysis for Forensics), que calculan parámetros por locus como la homocigosidad esperada, la heterocigosidad esperada, la heterocigosidad observada, el poder de discriminación o el poder de exclusión [44].

El LR se calcula como la relación entre dos hipótesis mutuamente excluyentes: la probabilidad del perfil genético en unas determinadas condiciones entre la probabilidad de esos resultados en otra hipótesis, alternativa y excluyente a la primera; ambas probabilidades se obtienen con el producto de las frecuencias alélicas obtenidas de la base de datos poblacional, teniendo como fundamento matemático que los alelos de los marcadores autosómicos son independientes: se heredan de forma mendeliana (como se ha visto a través de estudios de la meiosis), están en equilibrio Hardy-Weinberg y no hay asociación entre marcadores [45]:

$$LR = \frac{H_0}{H_1}$$

En un escenario de personas desaparecidas, grandes catástrofes o fosas comunes tendremos un pool de n víctimas, por lo que la probabilidad *a priori* será de $\frac{1}{v}$, siendo para un individuo concreto $\frac{1}{v-1}$, y la probabilidad *a posteriori* o probabilidad de identificación será $\frac{p}{1-p} = LR \cdot \frac{1}{v-1}$, el umbral de LR para una identificación será establecido por el laboratorio (uno muy alto dará falsos negativos, y uno muy bajo identificaciones espurias), dependiendo a su vez del número de víctimas (probabilidad *a priori*), la calidad y la cantidad de ADN, y la relación de parentesco entre la víctima y la muestra de referencia [46].

La probabilidad de que las muestras tengan *drop out* alélico implica tener esto en cuenta a la hora de obtener el LR, tradicionalmente calculada como $2p(1-p)+p^2$, trabajando con la probabilidad de *drop-out* en un marcador heterocigoto (D), así como de que no haya habido *drop-in* (C), siguiendo la siguiente fórmula [47]:

$$LR = \frac{\Pr(\bar{D}) \Pr(D) \Pr(\bar{C})}{p_a^2 \Pr(\bar{D}_2) \Pr(\bar{C}) + 2p_a p_Q \Pr(\bar{D}) \Pr(D) \Pr(\bar{C}) + p_Q^2 \Pr(D_2) \Pr(C)_{pa} + 2p_Q p_Q' \Pr(D)^2 \Pr(C)_{pa}}$$

Con respecto al cálculo del LR de diversas réplicas, se calculará el LR de cada una de ellas, sumándose todos los LRs obtenidos, teniendo en cuenta que los mismos no son sucesos independientes, sino que dependen del genotipo de la muestra [33,48].

Los resultados de Y-STRs y de ADNmt tendrán un cálculo diferente puesto que, como ya vimos, se heredan en bloque por línea paterna/materna respectivamente, por lo que tendrán que utilizarse bases de datos como YHRD o EMPOP. En el caso de los marcadores del cromosoma Y se establece la rareza de los marcadores obtenidos en base a una de las siguientes expresiones (a

decidir por el laboratorio, siendo x el número de veces que el haplotipo se ha observado en la base de datos y n el número de perfiles de la misma) [49]:

$$p = \frac{x}{n} / p = \frac{x+1}{n+1}$$

Por su parte, los marcadores X-STRs tienen una herencia algo más compleja, lo que habrá de tenerse en cuenta a la hora de calcular el LR; los cálculos derivados de la herencia en bloque de este cromosoma serían muy complejos, por lo que hay disponible software específico como MERLIN IN X o incluso paqueteres de R [50].

Con respecto al ADN mitocondrial, se utilizará la expresión $p = x/n$ junto con un intervalo de confianza obtenido con la expresión $p_0 = 1 - \alpha^{1/n}$, siendo α normalmente 0.05 (95% de confianza) [51].

Finalmente, el LR de los marcadores de tipo SNP se derivarán de las frecuencias poblacionales de FROG-kb, calculándose del mismo modo que en el caso de los STRs autosómicos [52]. Comparativamente hablando el poder de discriminación de los SNPs es mejor, siendo necesarios, por ejemplo, 92 para obtener una probabilidad similar a la del kit PowerPlex® Fusion [53].

Con respecto a la posibilidad de combinar las probabilidades obtenidas en los STRs autosómicos, los Y-STRs y el mtDNA, se puede hacer siempre y cuando pueda asegurarse la independencia genética, sin embargo esta es una cuestión sobre la que no hay consenso [54].

8. Bases de datos

Las bases de datos de ADN son bancos de datos que contienen perfiles genéticos. Dependiendo de su aplicación podemos encontrar bases de datos de tipo criminal, que no requiere consentimiento para la obtención de la muestra, y las bases de datos de tipo civil, que se caracterizan por ser voluntarias [55].

Actualmente hay disponibles diversos programas informáticos para bases de datos de ADN, algunas gratuitas (CODIS, EasyDNA, EasyPat, familias, Patern, RELPAIR), y otras de pago (Bloodhound, Bonaparte DVI, GeneMarker HID, GenoProof2, Genolab, Grape, Hugin, M-FISys, PatPCR, SmallPond, VAT), diferenciándose en cuestiones como los marcadores utilizados, la estrategia de búsqueda, la realización de cálculos estadísticos o el diseño gráfico de pedigrís [56].

Teniendo en cuenta las necesidades de investigación criminal, el FBI diseñó una base de datos nacional de ADN para Estados Unidos denominada CODIS (Combined DNA Index System), con el objetivo de facilitar la investigación de crímenes violentos y los cálculos estadísticos de las investigaciones, recogiendo un núcleo de marcadores mínimo (CODIS core STR loci) de detenidos, víctimas de un delito, personas desaparecidas y familiares, así como de muestras biológicas halladas en el lugar de los hechos [57]. Este conjunto de marcadores fue ampliado

posteriormente para reducir las identificaciones adventicias y mejorar la compatibilidad con otras bases de datos internacionales [58].

El software M-FISys™ (Gene Codes Forensics, Ann Arbor, MI, USA) fue desarrollado a raíz de los atentados del 11 de septiembre de 2001 por la necesidad de disponer de una base de datos civil para la identificación de las víctimas. El software es compatible con CODIS, es operable en red y permite cotejos entre muestras de referencia (directas o de familiares) y víctimas (por ejemplo restos óseos), con un cálculo de LR flexible e intuitivo y una capacidad de hasta 100.000 perfiles, admitiendo STRs autosómicos y de cromosoma Y, haplotipos de ADN mitocondrial y SNPs [59].

El software Bonaparte (Smart Research BV, Nijmegen, The Netherlands) está especialmente diseñado para grandes catástrofes, incluyendo STRs autosómicos y de cromosomas X e Y, así como SNPs y ADN mitocondrial, teniendo como principal prestación la elaboración de pedigrís con un sistema de arrastrar y soltar con el ratón, facilitando los cotejos entre familiares distantes, así como los cálculos estadísticos de las eventuales identificaciones [60].

La *European Network of Forensic Sciences Institutes* (ENFSI) ha elaborado una serie de recomendaciones para aquellos laboratorios que trabajen con bases de datos de ADN de personas desaparecidas, como son [56]:

- 1) Comparativas de 10-15 marcadores para identificaciones directas; las identificaciones indirectas deben confirmarse con otros marcadores como Y-STRs o ADN mitocondrial.
- 2) Mantener la base de datos criminal y la base de datos de personas desaparecidas separadas.
- 3) Utilización de software especializado para realizar los cotejos y los eventuales cálculos estadísticos.
- 4) Acreditación de los laboratorios bajo la norma ISO:17025 y participación en ejercicios de intercomparación.
- 5) Incluir al personal del laboratorio, visitantes y personal de mantenimiento en la base de datos.
- 6) Garantizar los derechos de los familiares en materia de protección de datos.

9. Conclusiones

La última etapa del análisis de ADN de muestras críticas comprende la visualización de resultados, la edición del perfil, y los cálculos estadísticos correspondientes en caso de producirse una identificación. La edición de perfiles en este tipo de muestras se vuelve especialmente desafiante, teniendo los cálculos mayor o menor complejidad dependiendo de la relación de familiaridad planteada. A este respecto son de gran utilidad los programas informáticos especializados.

10. Referencias

- [1] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Academic Press, San Diego, 2010.
- [2] B. Budowle, J. Smith, T. Moretti, J. DiZinno, *DNA TYPING PROTOCOLS: Molecular Biology and Forensic Analysis*, Eaton Publishing, Natrick, 2000.
- [3] Nelson, David L., Cox, Michael M., Hoskins, Aaron A., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 8th ed., Macmillan Learning, New York, 2021.
- [4] A.M. Guilliatt, Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis, in: B.D.M. Theophilus, R. Rapley (Eds.), *PCR Mutation Detection Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2002: pp. 1–12. <https://doi.org/10.1385/1-59259-273-2:001>.
- [5] A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA, *Nature*. 314 (1985) 67–73. <https://doi.org/10.1038/314067a0>.
- [6] J.W. Jorgenson, K.DeArman. Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298–1302. <https://doi.org/10.1021/ac00231a037>.
- [7] B.S. Dunbar, Use of Autoradiography in Polyacrylamide Gel Electrophoresis, in: B.S. Dunbar (Ed.), *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*, Springer US, Boston, MA, 1987: pp. 117–122. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1957-3_7.
- [8] B.J. Bassam, P.M. Gresshoff, Silver staining DNA in polyacrylamide gels, *Nat Protoc.* 2 (2007) 2649–2654. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>.
- [9] B.J. Bassam, G. Caetano-Anollés, P.M. Gresshoff, Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Analytical Biochemistry*. 196 (1991) 80–83. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90120-I](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90120-I).
- [10] M.R. Green, J. Sambrook, Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Cold Spring Harb Protoc.* 2020 (2020) pdb.prot100412. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>.
- [11] L.M. Smith, J.Z. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C.R. Connell, C. Heiner, S.B.H. Kent, L.E. Hood, Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*. 321 (1986) 674–679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>.
- [12] S. Rao-Coticone, P. Collins, P. Dimsoski, C. Ganong, L. Hennessy, C. Leibel, F. Shadravan, D. Reeder, Applications of 5-dye technology in forensic DNA typing and analysis, *International Congress Series*. 1239 (2003) 3–4. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00870-1](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00870-1).
- [13] G.E. Smith, The invention and early history of the CCD, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 607 (2009) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.nima.2009.03.233>.
- [14] J. Ju, A.N. Glazer, R.A. Mathies, Energy transfer primers: A new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis, *Nat Med.* 2 (1996) 246–249. <https://doi.org/10.1038/nm0296-246>.
- [15] J.M. Butler, E. Buel, F. Crivellente, B.R. McCord, Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis, *Electrophoresis*. 25 (2004) 1397–1412. <https://doi.org/10.1002/elps.200305822>.
- [16] J.R. Catai, E. Carrilho, Influence of the electrokinetic injection conditions on the separation of DNA fragments in capillary electrophoresis, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 413–420. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000300012>.
- [17] J.G. Shewale, L. Qi, L.M. Calandro, Principles, practice, and evolution of capillary electrophoresis as a tool for forensic DNA analysis, in: *Forensic Science Review*, CRC Press, 2013: pp. 131–162. <https://doi.org/10.1201/b15361-11>.
- [18] Promega Corporation, *Spectrum Compact CE System Operating Manual*, (2022). <https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/tmd058-spectrum-compact-ce-system-operating-manual.pdf?rev=4df0f17fa4114b5b960fb2265f176aba&la=en>.
- [19] Promega Corporation, *Spectrum CE System Operating Manual*, (2022). <https://www.promega.es/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/tmd/spectrum-ce-system-protocol-tmd052.pdf?rev=239908979f0c4b3fa54be483cdf32566&la=en>.
- [20] Applied Biosystems, *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide*, (2010). <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401661.pdf>.
- [21] A.A. Westen, J.H.A. Nagel, C.C.G. Benschop, N.E.C. Weiler, B.J. De Jong, T. Sijen, Higher Capillary Electrophoresis Injection Settings as an Efficient Approach to Increase the Sensitivity of STR Typing, *Journal of Forensic Sciences*. 54 (2009) 591–598. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01022.x>.
- [22] R. Hedell, C. Dufva, R. Ansell, P. Mostad, J. Hedman, Enhanced low-template DNA analysis conditions and investigation of allele dropout patterns, *Forensic Science International: Genetics*. 14 (2015) 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.008>.

- [23] A.A. Westen, L.J.W. Grol, J. Harteveld, A.S. Matai, P. de Knijff, T. Sijen, Assessment of the stochastic threshold, back- and forward stutter filters and low template techniques for NGM, *Forensic Science International: Genetics*. 6 (2012) 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.001>.
- [24] F. Duijs, L. van de Merwe, T. Sijen, C.C.G. Benschop, Low-template methods yield limited extra information for PowerPlex® Fusion 6C profiling, *Legal Medicine*. 33 (2018) 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.06.001>.
- [25] J.M. Esparza, M. Michalik, M.J. Dukes, P. Wojtkiewicz, Increasing Allele Detection by Altering the Quantity of Internal Lane Standard, *Journal of Forensic Sciences*. 61 (2016) S213–S220. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12945>.
- [26] Life Technologies, GeneMapper®ID-X Software Version 1.5, (2015). https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100031707_GeneMapIDX_ver1_5_ReferenceGuide.pdf.
- [27] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories, (2021). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_3f94c9a6286048c3924c58e2c230e74e.pdf.
- [28] R. Alaeddini, S.J. Walsh, A. Abbas, Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review, *Forensic Science International: Genetics*. 4 (2010) 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>.
- [29] Gill, Peter, Bleka, Øyvind, Hansson, Oskar, Benschop, Corina, Haned, Hinda, Low-template DNA, in: *Forensic Practitioner’s Guide to the Interpretation of Complex DNA Profiles*, Academic Press, n.d.: pp. 111–128. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-01233-2>.
- [30] C. Luce, S. Montpetit, D. Gangitano, P. O’Donnell, Validation of the AMPFℓSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit for Use in Forensic Casework*, *Journal of Forensic Sciences*. 54 (2009) 1046–1054. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01099.x>.
- [31] T. Tvedebrink, P.S. Eriksen, H.S. Mogensen, N. Morling, Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics, *Forensic Science International: Genetics*. 3 (2009) 222–226. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.02.002>.
- [32] T. Tvedebrink, P.S. Eriksen, H.S. Mogensen, N. Morling, Statistical model for degraded DNA samples and adjusted probabilities for allelic drop-out, *Forensic Science International: Genetics*. 6 (2012) 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.03.001>.
- [33] P. Gill, J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, J. Buckleton, An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Science International*. 112 (2000) 17–40.
- [34] C.C.G. Benschop, C.P. van der Beek, H.C. Meiland, A.G.M. van Gorp, A.A. Westen, T. Sijen, Low template STR typing: Effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results, *Forensic Science International: Genetics*. 5 (2011) 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.06.006>.
- [35] K.S. Grisedale, A. van Daal, Comparison of STR profiling from low template DNA extracts with and without the consensus profiling method, *Investigative Genetics*. 3 (2012) 14. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-3-14>.
- [36] Gill, Peter, Application of Low Copy Number DNA Profiling, *Croatian Medical Journal*. 42 (2001) 229–232.
- [37] Lucy, David, Conditional probability and Bayes’ theorem, in: *Introduction to Statistics for Forensic Scientists*, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, 2005.
- [38] J.M. Butler, *Forensic DNA typing*, Elsevier, Burlington, 2005.
- [39] R. Wenk, M. Traver, F. Chiafari, Determination of sibship in any two persons, *Transfusion*. 36 (1996) 259–262. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1996.36396182146.x>.
- [40] Chakraborty, Ranajit, Sample Size Requirements for Addressing the Population Genetics Issues of Forensic Use of DNA Typing, *Human Biology*. 64 (1992) 151–159.
- [41] National Research Council (U.S.). Committee on DNA Technology in Forensic Science, *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*, National Academy Press, Washington D.C., 1996.
- [42] M. Bodner, I. Bastisch, J.M. Butler, R. Fimmers, P. Gill, L. Gusmão, N. Morling, C. Phillips, M. Prinz, P.M. Schneider, W. Parson, Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on quality control of autosomal Short Tandem Repeat allele frequency databasing (STRidER), *Forensic Science International: Genetics*. 24 (2016) 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.008>.
- [43] C.M. Ruitberg, D.J. Reeder, J.M. Butler, STRBase: A short tandem repeat DNA database for the human identity testing community, *Nucleic Acids Research*. 29 (2001) 320–322. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.320>.

- [44] A. Gouy, M. Zieger, STRAF—A convenient online tool for STR data evaluation in forensic genetics, *Forensic Science International: Genetics*. 30 (2017) 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.007>.
- [45] A. Amorim, M. Crespillo, J.A. Luque, L. Prieto, O. Garcia, L. Gusmão, M. Aler, P.A. Barrio, V.G. Saragoni, N. Pinto, Formulation and communication of evaluative forensic science expert opinion—A GHEP-ISFG contribution to the establishment of standards, *Forensic Science International: Genetics*. 25 (2016) 210–213. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.09.003>.
- [46] B. Budowle, J. Ge, R. Chakraborty, H. Gill-King, Use of prior odds for missing persons identifications, *Investigative Genetics*. 2 (2011) 15. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-15>.
- [47] P. Gill, L. Gusmão, H. Haned, W.R. Mayr, N. Morling, W. Parson, L. Prieto, M. Prinz, H. Schneider, P.M. Schneider, B.S. Weir, DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods, *Forensic Science International: Genetics*. 6 (2012) 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.06.002>.
- [48] H. Haned, K. Slooten, P. Gill, Exploratory data analysis for the interpretation of low template DNA mixtures, *Forensic Science International: Genetics*. 6 (2012) 762–774. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.08.008>.
- [49] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM Interpretation Guidelines for Y-Chromosome STR Typing by Forensic DNA Laboratories, (2022). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_bc90bcfef52c43559aa28618ef87c424.pdf.
- [50] A.O. Tillmar, D. Kling, J.M. Butler, W. Parson, M. Prinz, P.M. Schneider, T. Egeland, L. Gusmão, DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis, *Forensic Science International: Genetics*. 29 (2017) 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.05.005>.
- [51] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories, (2018). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_f61de6abf3b94c52b28139bff600ae98.pdf.
- [52] Forensic Resource/Reference on Genetics - knowledge base, Forensic Resource/Reference On Genetics - knowledge base: FROG-kb User's Manual, (2017). https://frog.med.yale.edu/FrogKB/manual/userManual_V3.pdf.
- [53] H.-J. Lee, J.W. Lee, S.J. Jeong, M. Park, How many single nucleotide polymorphisms (SNPs) are needed to replace short tandem repeats (STRs) in forensic applications?, *Int J Legal Med*. 131 (2017) 1203–1210. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1564-z>.
- [54] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Supplemental Information for the SWGDAM Interpretation Guidelines for Y-Chromosome STR Typing by Forensic DNA Laboratories, https://www.Swgdam.Org/_files/Ugd/4344b0_f400dd61044a4a328b95362f46fcbf4c.Pdf. (2022). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_f400dd61044a4a328b95362f46fcbf4c.pdf.
- [55] J.A. Lorente, C. Entrala, J.C. Alvarez, M. Lorente, B. Arce, B. Heinrich, F. Carrasco, B. Budowle, E. Villanueva, Social benefits of non-criminal genetic databases: missing persons and human remains identification, *International Journal of Legal Medicine*. 116 (2001) 187–190. <https://doi.org/10.1007/s004140100255>.
- [56] ENFSI DNA Working Group, DNA database management. Review and recommendations, (2019). <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2021/09/ENFSI-DOCUMENT-ON-DNA-DATABASE-MANAGEMENT-2019.pdf>.
- [57] B. Budowle, T.R. Moretti, S.J. Niezgodna, B.L. Brown, CODIS and PCR-Based Short Tandem Repeat Loci: Law Enforcement Tools, in: *Second European Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, Innsbruck, Austria, 1998.
- [58] D.R. Hares, Expanding the CODIS core loci in the United States, *Forensic Science International: Genetics*. 6 (2012) 52–54. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.012>.
- [59] Cash, Howard D., Hoyle, Jonathan W., Sutton, Amy J., Development under extreme conditions: forensic bioinformatics in the wake of the World Trade Center disaster, *Pac Symp Biocomput.* (2003) 638–653.
- [60] K. Slooten, Validation of DNA-based identification software by computation of pedigree likelihood ratios, *Forensic Science International: Genetics*. 5 (2011) 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.06.005>.

Capítulo 7. Calidad de los resultados de un laboratorio de ADN forense



Nunca acabamos de aprender, Watson. Aprendemos de los más grandes hasta el final.

Sherlock Holmes, El círculo rojo.



Resumen: Con el objetivo de promover la confianza en los procesos y resultados proporcionados por un laboratorio, la Organización Internacional de Normalización ha elaborado una norma para demostrar que los laboratorios de ensayo son competentes y generan resultados válidos: la ISO/IEC 17025:2017. Esta norma se ha constituido como un estándar de calidad internacional, configurándose además como requisito para formar parte de determinadas redes de laboratorios, o para volcar perfiles en bases de datos genéticas nacionales. El presente capítulo pretende hacer una revisión de los diferentes requisitos planteados por la norma (imparcialidad y confidencialidad, estructura, recursos, proceso, y sistema de gestión), incidiendo especialmente en la manera en que estos requerimientos afectan a un laboratorio de genética forense.

Palabras clave: Acreditación; Calidad; Genética forense; ISO 17025; Laboratorio de ensayo

Abstract: With the main goal of promoting confidence in performed processes and results provided by a laboratory, the International Normalization Organization has developed requirements, so laboratories are able to demonstrate their capabilities and validity of the results they generate: ISO/IEC 17025:2017. This standard has become not only as an international quality sign, but also a requirement for joining certain forensic science scientific networks or uploading genetic profiles to national genetic databases. This chapter pretends to review the different dispositions contained in the standard (impartiality and confidentiality, structure, resources, process and system), specially stressing in how this requirements affect a forensic genetics laboratory.

Keywords: Accreditation; Forensic genetics; ISO 17025; Quality; Testing laboratory

1. Introducción

Los tribunales, la sociedad en general, demandan no solamente un producto, sino que este reúna unos requisitos mínimos de calidad y de aseguramiento del resultado: se demanda que los resultados obtenidos lo hayan sido conforme a un método riguroso, aceptado por la comunidad científica internacional, validado. Este capítulo final tiene el objetivo de enmarcar estas exigencias en el análisis forense de ADN de restos óseos degradados. Para ello, como estructura argumental de este capítulo nos remitiremos a los requisitos, recomendaciones y posibilidades recogidas en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 [1].

2. Requisitos generales: imparcialidad y confidencialidad

Los dos primeros requisitos establecidos por la norma son los de imparcialidad y confidencialidad, esto es, que los resultados obtenidos lo han sido conforme a un método riguroso y aséptico alejado de cualquier interés personal, quedando, además, protegido por la relación laboratorio-cliente de acceso a esta información por parte de terceros.

El trabajo forense está rodeado de interesados (tanto de los propios servicios forenses como de la esfera policial, la esfera judicial, el orden público, y la opinión pública) y de factores que inconscientemente pueden afectar a la toma de decisiones, desde la propia naturaleza humana hasta específicas del caso, pasando por el ambiente, la cultura y la propia experiencia, o incluso intereses comerciales; por eso es importante adoptar medidas de identificación de riesgos potenciales de imparcialidad, tomar medidas como la comunicación empleado-empleador para detectar riesgos potenciales o la realización de ejercicios ciegos por parte de aquellos, así como tomar acciones correctivas como el entrenamiento del personal [2].

Igualmente, uno de los riesgos que tiene el análisis forense de ADN es la confidencialidad, sobre todo a la hora de tener una base de datos con información genética de personas, datos especialmente protegidos por la Directiva (UE) 2016/680 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, y por la Ley Orgánica 7/2021, de 26 de mayo, de protección de datos personales tratados para fines de prevención, detección, investigación y enjuiciamiento de infracciones penales y de ejecución de sanciones penales. En este sentido se venían haciendo recomendaciones como que los análisis se hagan sobre ADN no codificante [3], no obstante, la implementación de los SNPs fenotípicos y de ancestralidad ha traído nuevos riesgos, por lo que son más importantes que nunca el consentimiento informado y la protección de datos, con medidas de seguridad como los controles administrativos (política de protección de datos, de seguridad informática y entrenamiento del personal), controles físicos (control de acceso a los datos) y controles técnicos (autenticación, registro de usuarios y del sistema, copias de seguridad) [4].

3. Requisitos relativos a la estructura

Los requisitos relativos a la estructura se refieren a la organización del laboratorio como entidad legal, requiriendo que se identifique a la persona o personas con responsabilidad en el mismo: se debe definir y documentar las actividades que realiza el laboratorio, así como la organización y la jerarquía del laboratorio, especificando especialmente las responsabilidades, autorizaciones e interrelaciones de todo el personal que lleva a cabo o supervisa trabajos que pueden afectar a la calidad de las actividades del laboratorio [5].

Los directores y supervisores de un laboratorio forense tienen diversos compromisos para con el correcto funcionamiento del laboratorio, procurando la garantía de la integridad, la calidad, la eficiencia, la productividad y la seguridad del laboratorio; velar por la calificación, competencia y entrenamiento del personal del laboratorio, así como por su supervisión en un ambiente marcado por la comunicación; detectar conflictos de intereses y cumplir los receptos legales, normativos, reglamentarios y de calidad; profesionalismo marcado por el desafío de la acreditación, la certificación y las eventuales labores de investigación [6].

4. Requisitos relativos a los recursos

La norma regula la necesidad de que los laboratorios dispongan de los medios necesarios para realizar las actividades que realiza, como son los recursos humanos (personal), infraestructura (instalaciones) y el equipamiento.

4.1. Personal

Se han hecho desde diferentes organismos distintas recomendaciones sobre la formación (técnica, graduado, etc.) que debe tener el personal que trabaje en un laboratorio de ADN forense. La SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) establece que el personal debe tener formación en los siguientes campos [7]:

- 1) Bioquímica (biomoléculas, enzimas, ADN, transducción, metabolismo y transporte de membrana)
- 2) Genética (herencia, genes y cromosomas, mutación, mitosis y meiosis, recombinación y expresión)
- 3) Biología molecular (estructura genética de procariotas y eucariotas, interrelación entre ADN y ARN y síntesis de proteínas, transcripción, traducción y replicación, expresión y regulación, técnicas de ADN recombinante, PCR y secuenciación de ADN)
- 4) Genética de poblaciones (principio de Hardy-Weinberg, estructura de poblaciones, deriva, mutaciones, migraciones y selección)
- 5) Estadística (análisis descriptivo, distribuciones, intervalo de confianza, variables discretas y continuas, contraste de hipótesis, probabilidad y teorema de Bayes).

Independientemente de su formación, el personal del laboratorio debe tener experiencia y demostrar su competencia, teniendo un periodo de formación inicial que puede culminar en un ensayo de aptitud previo al trabajo con las muestras habituales del laboratorio [8].

4.2. Instalaciones y condiciones ambientales

El laboratorio debe contar con áreas de pre-PCR y post-PCR físicamente separadas para evitar la contaminación con productos de amplificación, los suelos serán de material de laboratorio antideslizante (como vinilo), con esquinas lavables, mobiliario resistente a productos químicos, condiciones adecuadas de iluminación y temperatura, así como presión negativa en el área de post-PCR [9].

Si se trabaja con muestras críticas o muy degradadas el trabajo con estas debe realizarse en un área aislada, el personal debe llevar equipo de protección individual (mono, mascarilla, calzas y guantes), y las superficies deben descontaminarse con lejía al 3-10%, etanol al 70% e irradiación con luz ultravioleta, debiendo contar esta área con presión positiva para evitar la entrada de material a la sala [10].

El laboratorio debe contar con un plan de prevención y detección de contaminaciones con la utilización de blancos de extracción, controles negativos y positivos de PCR, y un plan de actuación dependiendo de la frecuencia (puntual o constante) y magnitud de la misma, con acciones que pueden ir desde la reinyección de la muestra, re-amplificación o re-extracción de la misma hasta el hisopado de las superficies y equipamiento del laboratorio; la suspensión del trabajo, la descontaminación y la revisión del caso serán las acciones correctivas a ejecutar [11].

4.3. Equipamiento

La norma establece que el laboratorio debe de disponer del equipamiento necesario para sus funciones, debiendo estar verificado y calibrado, con un registro con su identificación, fabricante y número de serie, verificación, ubicación, fechas de ajustes y calibraciones y criterios de aceptación, materiales de referencia, plan de mantenimiento y detalles de cualquier mal funcionamiento. Además, algunos materiales como las pipetas, las balanzas o las sondas de temperatura deberán estar calibrados, bien internamente, bien externamente por una empresa acreditada. Como mínimo podremos encontrar los recogidos en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Recomendaciones de equipamiento y material para un laboratorio forense de análisis de ADN [12]

Etapa del análisis	Equipos y material necesarios
Extracción de ADN	-Tubos de microcentrífuga -Gradillas -Bisturíes, pinzas -Papel de filtro -Mascarillas y batas de laboratorio -Guantes

	-Contenedores de material biológico y de cortantes y punzantes - <i>Buffers</i> y reactivos de extracción -Equipo de extracción automatizada si procede
Amplificación	-Termociclador -Kits de amplificación -Tubos para PCR -Contenedores de material biológico -Lejía y alcohol de limpieza
Electroforesis capilar	-Analizador genético -Guantes -Consumibles del equipo (<i>buffer</i> , polímero) -Placas, <i>septas</i> y adaptadores -Capilar -Formamida -Escalera alélica -Software de <i>sizing</i> y <i>genotyping</i>

4.4. Trazabilidad metrológica

La trazabilidad metrológica es la propiedad de una medida de poder ser trazada con respecto a una referencia a través de una cadena de calibraciones documentadas, utilizando para ello evidencia objetiva como productos y servicios externos de laboratorios acreditados [13]. Esta trazabilidad afecta a la calibración de los equipos (por ejemplo, micropipetas), a los materiales de referencia (por ejemplo, sondas de temperatura y masas patrón), y a las bases de datos poblacionales empleadas en la interpretación de los resultados [14].

4.5. Productos y servicios suministrados externamente

El laboratorio debe contar con criterios predefinidos para la selección, seguimiento y evaluación de los proveedores, así como los requisitos de los productos adquiera externamente, como son reactivos, equipos, material de referencia o servicios de calibración; estos criterios pueden ser estar acreditado, disponibilidad, competencia técnica, disponibilidad, histórico, referencias, o la habilidad para entregar los productos en tiempo, con un menor coste, con la documentación adecuada, o demostrar la validación, trazabilidad metrológica u otras características [15].

En este sentido uno de los criterios de selección de un producto es la acreditación bajo la norma ISO 18385:2016 para minimizar el riesgo de contaminación con ADN humano durante la fabricación de productos para análisis con fines forenses, usualmente expuesto en una etiqueta en la que figura “Forensic-Grade” [16].

5. Requisitos relativos al proceso

La ISO 17025 regula todo lo relativo al análisis o ensayo, desde que se recibe la muestra o ítem de ensayo hasta la emisión de un informe con los resultados obtenidos, pasando por la validación de los diferentes métodos utilizados para la obtención del resultado consignado en el informe.

5.1. Revisión de solicitudes, ofertas y contratos

Debe hacer una comunicación entre el cliente y el laboratorio que permita proporcionar el ensayo más adecuado para sus necesidades, debiendo estar este aspecto adecuadamente definido, documentado y entendido, haciéndose una evaluación de la capacidad del laboratorio para afrontar el ensayo requerido, seleccionando el ensayo más adecuado para la petición del cliente, y registrando cualquier comunicación entre ambas partes [17].

5.2. Selección y verificación de métodos

En este punto la norma establece una regulación para la selección del método para la obtención de un resultado, distinguiendo entre métodos normalizados (publicados en normas nacionales, regionales, o internacionales), métodos internos basados en métodos normalizados, y métodos internos desarrollados por el laboratorio; en cualquier caso, el laboratorio debe disponer de evidencias de haber sido evaluada la idoneidad del mismo a través de una estrategia de validación, debiendo además estar su elección justificada técnicamente [18].

En nuestro campo no hay ninguna norma internacional que regule los análisis a realizar, de modo que la elección del método va a depender del tipo de muestra, de las necesidades del laboratorio, y de las necesidades del cliente. Así, un laboratorio puede basar sus métodos internos en el protocolo del kit o equipo que esté utilizando, o bien en publicaciones científicas [19]. A este respecto la ISFG recomienda que el método elegido sea susceptible de ensayo de intercomparación, o en todo caso, de una técnica ya descrita para asegurar la posibilidad de obtener una segunda opinión [20].

5.3. Validación de métodos

La manera que tiene un laboratorio de asegurar la eficacia de un método determinado previamente escogido para la obtención de un resultado es a través de la validación. A este respecto debemos distinguir entre [21]:

- *Validación de desarrollo (developmental validation)*. Determinación de las condiciones de una tecnología nueva, previa a la determinación de las condiciones o parámetros de aplicación de un método.
- *Validación interna (internal validation)*. Datos que determinan la aplicación de un determinado método por un laboratorio, así como los límites de este, demostración de que una metodología se comporta como se espera.
- *Validación (validation)*. Evaluación de una serie de experimentos que exploran la eficacia, exactitud y limitaciones de un determinado método.

Por ejemplo, un artículo científico expone la amplificación de ADN mitocondrial mediante un determinado kit comercial (*developmental validation*), ese mismo método es adoptado por un

laboratorio tras probar su funcionamiento con sus muestras (*validation*), y finalmente determina, entre otros parámetros, las cantidad mínimas y máximas de ADN de partida (*internal validation*).

Los estudios de validación interna se recomiendan tanto para los sistemas de extracción de ADN como para los de cuantificación, amplificación y detección, así como el software utilizado en la interpretación de los resultados [22], incluyendo los parámetros que se incluyen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros a estudiar en una validación [22]

Estudio	Descripción	
Muestras conocidas	Aplicación del método con muestras conocidas y comparación de resultados	
Sensibilidad y umbral estocástico	Determinación del rango dinámico, rango ideal, límite de detección, límite de cuantificación, balance de heterocigosidad, ratio señal/ruido.	
Precisión y exactitud	<i>Precisión</i>	Desviación estándar de los diferentes resultados obtenidos
	<i>Exactitud</i>	Conformidad entre el valor obtenido y el valor real
	<i>Repetitividad</i>	Precisión y exactitud de los resultados en un mismo operario/instrumento
	<i>Reproducibilidad</i>	Precisión y exactitud de los resultados entre operarios/instrumentos
Mezclas	Estudios con mezclas representativas del trabajo del laboratorio	
Contaminación	Detección de ADN exógeno de reactivos, consumibles, otras muestras, operarios y ambiente del laboratorio	
NGS	Estudios de sensibilidad para establecer los límites de detección en relación con la cantidad de ADN y la calidad de las librerías	

Se han establecido una serie de criterios mínimos para validar un método, de manera que cualquier cambio en una técnica (reactivos, kit empleado o instrumento utilizado) que pueda influir en el resultado final deberá validarse nuevamente, siendo la metodología utilizada la que se muestra en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Parámetros de validación interna en cada etapa analítica [23]

Etapa del análisis	Parámetro	Descripción
Test presuntivos	No se dan especificaciones concretas debido a la gran variedad de test existentes.	
Extracción de ADN	<i>Muestras</i>	Las habituales del laboratorio
	<i>Repetitividad</i>	5 réplicas de la misma muestra
	<i>Reproducibilidad</i>	5 réplicas de la misma muestra extraídas por otra persona en otra extracción
	<i>Sensibilidad</i>	5 diluciones seriadas en 3 réplicas

	<i>Rendimiento</i>	Comparación entre réplicas del estudio de sensibilidad
	<i>Efecto de la matriz</i>	Influencia del sustrato de la muestra en la extracción
Cuantificación de ADN	<i>Repetitividad</i>	5 réplicas de ADN estándar
	<i>Reproducibilidad</i>	5 réplicas de estándar cuantificadas por otra persona
	<i>Sensibilidad</i>	5 diluciones seriadas con 3 réplicas
	<i>Otros estudios</i>	- Determinación de la relación entre cantidad de ADN y perfil - Sensibilidad a inhibidores - Detección de ADN masculino y femenino en mezclas - Conservación en el tiempo de estándares y muestras
Termociclador	<i>Sensibilidad</i>	Diluciones seriadas en 3 réplicas
	<i>Repetitividad</i>	3 réplicas de una misma muestra distribuidas en el bloque
	<i>Reproducibilidad</i>	3 repeticiones de una amplificación
	<i>Homogeneidad</i>	Control de temperatura del bloque y comparación de las réplicas
Kit de amplificación	<i>Repetitividad</i>	5 réplicas de la misma muestra
	<i>Reproducibilidad</i>	5 réplicas de la misma muestra (amplificaciones diferentes)
	<i>Sensibilidad</i>	5 diluciones seriadas con 3 réplicas
	<i>Mezclas</i>	Diferentes ratios de mezcla (si procede)
	<i>Balance de picos</i>	Ratio >60%
	<i>Ratio de stutter</i>	Comprobar cumplimiento del % del fabricante
	<i>Concordancia</i>	Estudio con productos de PCR que dieron buenos perfiles (completos y balanceados)
Equipo de electroforesis	<i>Otros parámetros</i>	-Sensibilidad a inhibidores y degradación -Detección de ADN masculino/femenino
	<i>Repetitividad</i>	5 réplicas de la misma muestra
	<i>Reproducibilidad</i>	5 réplicas de la misma muestra (amplificaciones diferentes)
	<i>Sensibilidad</i>	5 diluciones con 3 réplicas
	<i>Mezclas</i>	Diferentes ratios de mezclas con 3 réplicas
	<i>Balance de picos</i>	Balance de heterocigosidad >60%
	<i>Ratio de stutter</i>	Comprobar el cumplimiento del % del fabricante
	<i>Precisión</i>	Ventana de los alelos de ± 0.5 pb
Software	<i>Concordancia</i>	Estudio con productos de PCR que dieron perfiles completos y balanceados
	<i>Otros parámetros</i>	-Número máximo de carreras por capilar -Tiempo máximo de conservación del polímero
		-Concordancia -Trazabilidad de los datos -Método de cálculo

5.4. Muestreo

La norma establece que el laboratorio debe tener un plan de muestro que describa la selección de muestras o sitios, el plan de muestreo, así como la preparación y tratamiento de las muestras para

el ulterior ensayo. Con respecto a los restos óseos y la mejor selección de muestra no tenemos más que remitirnos a lo visto en el Capítulo 1 (petroso, diente o diáfisis de hueso largo).

5.5. Manipulación de los ítems de ensayo

Las muestras de referencia como los hisopados bucales deben dejarse secar lo más pronto posible para evitar la proliferación de microorganismos, que conllevaría degradación del ADN; además, dependiendo de las condiciones ambientales, dejar los hisopos a temperatura ambiente puede conllevar una pérdida de calidad del perfil genético en muy poco tiempo, por lo que es recomendable preservar adecuadamente los hisopos [24]. En la **Tabla 4** se muestran las recomendaciones de preservación establecidas para diversos tipos de muestras.

Tabla 4. Recomendaciones de almacenamiento a corto y largo plazo de diferentes muestras biológicas [25].

Tipo de muestra	Congelado < -10°C	Refrigerado 2-8°C <25% humedad	Temperatura controlada 15,5-24°C	Temperatura ambiente
Corto plazo				
Hisopado bucal			Recomendable	< 24 horas
Restos óseos	Aceptable		Aceptable	Aceptable
Sangre líquida	Nunca	Recomendable	< 24 horas	
Orina	Recomendable	< 24 horas		
Mancha seca			Recomendable	Aceptable
Mancha húmeda	Recomendable	Aceptable	< 24 horas	
Pelos			Recomendable	Aceptable
Hisopados		Recomendable (húmedo)	Recomendable (seco)	
Lavado vaginal			Recomendable	
Heces	Recomendable			
Largo plazo				
Hisopado bucal			Recomendable	
Restos óseos			Recomendable	
Sangre líquida	Nunca	Recomendable		
Orina	Recomendable			
Mancha seca			Recomendable	
Pelos			Recomendable	
Hisopados			Recomendable (seco)	
Lavado vaginal			Recomendable	
Heces				
Extracto de ADN	Recomendable (líquido)	Aceptable	Aceptable (deshidratado)	

5.6. Registros técnicos

Los registros técnicos contienen toda la información relevante de las actividades del laboratorio aplicadas a la muestra, incluyendo el tipo de ensayo, la fecha y la hora a la que se realizó y el analista, de manera que quede registrado exactamente cómo se hizo el ensayo [26].

5.7. Aseguramiento de la validez de los resultados

El laboratorio debe contar con un seguimiento de la validez de los resultados que proporciona, lo que incluye el uso de materiales de referencia, el uso de instrumentos alternativos, comprobar el funcionamiento de los equipos, el uso de patrones de verificación, las comprobaciones intermedias de medición o la repetición de un ensayo; a este respecto son de vital importancia los ensayos de aptitud.

Un ensayo de aptitud (*proficiency test*) es una evaluación de la capacidad de un analista o de un laboratorio de dar un resultado mediante el análisis de muestras biológicas que han sido previamente analizadas, evaluándose la concordancia del resultado obtenido; un ensayo de aptitud puede ser interno (proveído por una persona perteneciente a la organización del laboratorio) o externo (suministrado por una organización interna), siendo el objetivo final garantizar, si es superado con éxito, un cierto grado de confianza en un análisis forense real [27].

Este tipo de pruebas a ciegas tratan de evaluar el sistema de control de calidad del laboratorio analizando la capacidad de utilizar un método analítico determinado para dar un resultado, así como la especificidad del ensayo teniendo en cuenta la exactitud, precisión y los límites de detección del mismo [28]. Los distintos tipos de ensayo se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de los diferentes modelos de ensayo de aptitud [29].

Nivel	Descripción	Ventajas	Inconvenientes
Sistema	El laboratorio no sabe que va a someterse a un ensayo de aptitud, la muestra es enviada y camuflada como una de rutina por una organización mayor de la que forma parte	-Se prueba todo el sistema -Situación real -Gran escala	-Requiere una gran planificación -Riesgo de que la prueba deje de ser secreta
Laboratorio	El personal del laboratorio no sabe cuándo va a enviarse la prueba al formar parte de su flujo de trabajo recibir muestras de otros laboratorios	-Los ítems son fáciles de elaborar -Menos complejidad -Gran escala	-No se prueba todo el sistema -Riesgo de que la prueba deje de ser secreta
Analista	El analista es el único que no sabe nada de la prueba, que puede ser suministrada por los administradores del laboratorio	-Menor complejidad -Planificación y ejecución más sencilla -Gran escala	-No se puede probar todo el sistema -Riesgo de que la prueba deje de ser secreta
Reanálisis	Prueba a ciegas de una muestra previamente analizada	-Se puede probar todo el sistema -No requiere preparación de ítems	-No es posible hacerlo a gran escala -No se puede garantizar la aleatoriedad

Hay diversas organizaciones nacionales e internacionales que desarrollan ensayos de aptitud (ensayos de inter-comparación), como son el GHEP-ISFG, GITAD, el GEDNAP, la ENFSI y el NIST.

- *GHEP-ISFG*: El Grupo de Habla Española y Portuguesa de la *International Society for Forensic Genetics* lleva a cabo desde 1995 y bajo la coordinación del Servicio de Calidad del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses un ejercicio colaborativo de análisis de ADN, con un incremento de participantes de 10 en 1992 a 89 en 2002; el ejercicio consiste en un módulo básico y otro avanzado, proponiéndose en ambos tanto ejercicios de parentesco como forenses, incluyéndose un ítem no humano [30].
- *GITAD*: El Grupo Iberoamericano de Trabajo en Análisis de DNA se fundó en 1998 con la idea de coordinar los esfuerzos de los laboratorios en Iberoamerica y facilitar la comunicación, el intercambio de experiencia, e instaurar un ejercicio de aptitud que empezó en el año 1999, consistiendo en 4 manchas de sangre (ejercicio básico) e incorporándose desde 2007 una muestra forense opcional [31].
- *GEDNAP*: El *German DNA Profiling Group* nació en los años 80 en el seno de la Sociedad Alemana de Medicina Legal, con el fin de evaluar los resultados de los laboratorios que formaban parte del sistema judicial alemán, creciendo hasta alcanzar 235 participantes de 37 países (mayormente europeos) en 2012; la prueba consiste en dos conjuntos de muestras, tres de referencia y 4 forenses [32].
- *ENFSI*: La *European Network of Forensic Science Institutes* se fundó en 1995 con el objetivo de facilitar el intercambio de información entre los laboratorios forenses de Europea, trabajando en los campos de control de calidad, competencia, educación, entrenamiento, e investigación y desarrollo con 17 grupos de expertos diferentes, uno de ellos dedicado al ADN [33]. Cuenta con ejercicios de ADN no humano (DNA species ID), plantas (Plant), suelo (Soil), y ADN humano [34].
- *NIST*: El *National Institute of Standards and Technology*, fundado en 1901, forma parte del Departamento de Comercio de las Naciones Unidas, jugando un importante papel en el desarrollo de la Genética forense mediante investigación en secuenciación de nueva generación, interpretación de mezclas y fabricación de material de referencia (SRM 2391b para ADN genómico y SRM 22395 para cromosoma Y) [35,36].

5.8. Informe de resultados

Los resultados deben revisarse y autorizarse y ser suministrados al cliente de manera exacta, clara, inequívoca y objetiva, estableciendo la norma una información mínima que debe consignarse en el informe (elementos como el método utilizado, descripción del ítem, fecha de recepción, fechas de ejecución del análisis y de emisión del informe, etc.), de manera que las opiniones e

interpretaciones que se expresen deben basarse únicamente en el ítem ensayado, identificándose claramente como tales.

La Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN ha elaborado una serie de recomendaciones para el informe pericial emitido por un laboratorio de identificación genética, estos criterios se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Recomendaciones de la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN [37].

Materia	Recomendaciones	
Cuerpo del informe	<i>Descripción</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Título -Identificación del laboratorio -Identificación del solicitante -Descripción del objeto de análisis -Identificación de las muestras -Fecha de ejecución -Identificación de métodos empleados
	<i>Resultados y conclusiones</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Expresión sencilla y clara -Valoración estadística
	<i>Referencias y notas</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Referencias sobre la metodología -Destino de las muestras sobrantes -Posibilidad de análisis adicionales -Identificación de los firmantes y fecha
Resultados	-Resultados de aSTRs, Y-STRs y ADNmt en forma de tabla	
Evaluación de resultados	<ul style="list-style-type: none"> -Expresión del resultado del LR -Explicación del valor de LR obtenido -Indicación de la base de datos poblacional empleada -Utilización de YHRD para Y-STRs y EMPOP para ADNmt 	
Inclusión de perfiles en bases de datos	<ul style="list-style-type: none"> -Indicación de que los datos se introducen en una base de datos -Coincidencia evaluada estadísticamente con LR 	

5.9. Quejas

La norma establece también la obligación de disponer de un procedimiento para recibir, evaluar, y tomar decisiones en base a las quejas que se le formulen. Las quejas no deben verse como una necesidad de confrontación del cliente, sino de un interés en buscar soluciones: una queja puede deberse a un malentendido con el cliente en la contratación del servicio, lo que puede traducirse para el laboratorio en una mejora en la presentación del contenido o de los datos que responden a la cuestión planteada; una queja puede deberse también en el cumplimiento del contrato (selección del método o ensayos planteados, por ejemplo), lo que puede traducirse en una necesidad de

mejora en el entrenamiento del personal en lo que a asignación del trabajo se refiere; las quejas pueden referirse también a los datos, en cómo se expresan o qué incertidumbre se les asocia (poniendo en manifiesto mejoras necesarias en la transferencia de datos) [38].

5.10. Trabajo no conforme

La gran sensibilidad de la PCR implica la probabilidad de falsos positivos en los resultados por la acción de diferentes mecanismos de contaminación; es muy difícil eliminarla una vez se produce, por lo que la clave está en disponer de mecanismos adecuados de prevención [39].

Una contaminación puede provenir de diferentes fuentes: personal del laboratorio, reactivos y consumibles, contaminación cruzada con otras muestras, o las superficies, equipamiento o sistema de ventilación del propio laboratorio, pudiendo ser la transferencia de la contaminación directa o indirecta (a través de los guantes, superficies, etc.) [11].

Hay una serie de medidas generales a implementar para prevenir la contaminación: áreas separadas para muestras de referencia y muestras mínimas; vestuarios para el cambio de ropa; limpieza regular de las superficies del laboratorio; utilizar equipos de protección individual (bata de laboratorio, mascarilla, cofia, cubrebarba); batas de laboratorio diferentes para cada zona; utilizar reactivos de grado de Biología molecular; usar material fungible desechable; utilizar fungible libre de ADN; acceso restringido al laboratorio; manipular las muestras lo mínimo posible; y disponer de procedimientos de descontaminación [40]. En la **Tabla 7** se recogen medidas concretas con respecto al laboratorio, el personal y los procedimientos.

Tabla 7. Medidas de prevención de la contaminación [11].

Diseño del laboratorio	<p>Áreas separadas.</p> <p><i>Pre-PCR</i>: acceso restringido, actividad limitada al laboratorio, equipamiento y EPIs exclusivos, superficies lavables, separar reactivos de extractos de ADN, circulación de aire, presión positiva.</p> <p><i>Post-PCR</i>: filtración de aire, presión negativa, equipamiento y EPIs exclusivos, separar preparación y almacenamiento de productos de PCR, no pasar ningún elemento a Pre-PCR.</p>
Procedimientos	<p>Evaluación del impacto de la sensibilidad de las técnicas.</p> <p>Establecer niveles de tolerancia de la contaminación.</p> <p>Determinar la descontaminación necesaria de reactivos y fungibles.</p> <p>Utilizar control negativo, control positivo y blanco de extracción.</p> <p>Investigar las contaminaciones si se producen.</p> <p>Modificar los protocolos para un riesgo mínimo de contaminación.</p>
EPIs	<p><i>Batas de laboratorio</i>: utilizar batas exclusivas para cada área.</p> <p><i>Guantes</i>: todo el personal debe utilizar guantes, cambiándolos a menudo o lavándolos con lejía, especialmente después de tocar objetos. Se recomienda llevar dos guantes, debiendo llegar hasta la manga.</p> <p><i>Mascarillas</i>: debe usarse mascarilla que cubra nariz y boca, descartándose una vez terminada la actividad.</p> <p><i>Cofias</i>: pueden utilizarse como protección adicional, debiendo cubrir cabeza y vello facial.</p>
Personal	Entrenamiento del personal para prevenir y reconocer contaminaciones.

Muestras	Examinar las muestras en un área limpia. Cambiar de guantes entre muestras. Anotar cualquier anomalía que se observe en las muestras o su embalaje. Descontaminar las herramientas (bisturí, tijeras) después de cada uso. Se pueden examinar las muestras sobre papel de filtro, descartándose tras su uso.
Limpieza	Una rutina de limpieza con lejía es clave para prevenir contaminaciones. Área Pre-PCR: superficies, equipos, pomos, frigoríficos, cabinas de flujo laminar tras cada uso. Semanal o mensualmente se recomienda una limpieza en profundidad. Área Post-PCR: limpieza constante según el volumen de trabajo, descartar los productos de amplificación y placas preparadas, descontaminar cada equipo después de su uso.
Reactivos	Los reactivos deben estar descontaminados o cumplir en su caso con la ISO 18385. Anotar los números de lote de todos los reactivos utilizados. Debe asegurarse la esterilidad de los reactivos preparados por el propio laboratorio (autoclave o luz UV).

La detección de la contaminación puede hacerse por la observación de alelos en los blancos de extracción o en los controles negativos, como *drop in* en los controles positivos, o como la observación de perfiles mezcla en muestras en las que no se espera una mezcla; estos perfiles extraños deberán compararse con las muestras del mismo lote o de otros, así como con el personal del laboratorio [11].

Una vez detectada la contaminación debe determinarse su origen, pudiendo establecer cuatro niveles: 1) contaminación aislada de bajo nivel, 2) contaminación aislada grosera, 3) contaminación sistemática de bajo nivel, y 4) contaminación sistemática grosera; las contaminaciones aisladas se producen por eventos aislados, mientras que las sistemáticas tienen un origen común: una persona, un procedimiento, o una fuente de contaminación; en cualquier caso, una vez la contaminación se ha definido e identificado, se llevarán a cabo las siguientes medidas [11]:

- 1) Suspensión del trabajo.
- 2) Descontaminación de las áreas afectadas.
- 3) Revisión de los trabajos afectados por la contaminación.
- 4) Entrenamiento del personal.
- 5) Revisión de la eficacia de las medidas correctivas.

Para prevención y tratamiento de la contaminación, el mayor aliado del laboratorio va a ser el hipoclorito de sodio (lejía) diluido al 1-2%, muy por encima del agua destilada o el etanol al 96% [41].

5.11. Control de los datos y gestión de la información

La integridad de los datos es el aseguramiento de que la información no se ha alterado o ha sido modificada, alterada o destruido accidental o maliciosamente, protegiendo la información y asegurando su inalterabilidad; la validación de los datos son las pruebas necesarias para establecer el cumplimiento de unas determinadas especificaciones de seguridad [42].

En este punto se tratan cuestiones propias de la ciberseguridad como son el acceso a los datos por parte de usuarios registrados y autorizados, el control de accesos físico a las zonas donde se encuentran los sistemas de información, la protección de la información, el control de accesos mediante mecanismos de identificación, autenticación y autorización, el mantenimiento de los sistemas de información, la gestión de incidentes de ciberseguridad (identificación, registro y resolución), la continuidad de los servicios (por ejemplo, en caso de cortes de luz), la protección de datos y, en general, el aseguramiento del cumplimiento de estas medidas [43].

El trabajo con un equipo en red (como un servidor) implica una serie de riesgos: manipulación de los registros de actividad, suplantación de identidad, abuso de privilegios, acceso no autorizado, negación de actuaciones, denegación de servicio o el robo de equipos; para prevenir esta problemática se recomienda tener habilitada la opción de auditoría que registre modificaciones en los datos del equipo, la realización de copias de seguridad, y el cifrado de datos [44].

Las copias de seguridad pueden hacerse en una red privada (servidor) y/o en la nube, debiendo en todo caso contar con una protección física (condiciones ambientales adecuadas y acceso restringido) y con los requisitos fundamentales en materia de criptografía, auditoría, autenticación, administración y funcionalidad [45].

6. Requisitos relativos a la gestión

El laboratorio debe documentar todos y cada uno de los requisitos de la norma, es decir, que todas las acciones que quedan bajo la acreditación deben estar documentadas en la forma de un procedimiento (cómo se hace) o de un registro (prueba documental de que se ha hecho). A este respecto hay muchas opciones, siendo la más implementada en los laboratorios forenses la de un sistema LIMS.

6.1. Documentación del sistema de gestión

El sistema LIMS (*Laboratory Information Management System*, un paquete de datos de Microsoft Access, actualmente SQL, *Structured Query Language*, que permite ejecutar y comunicarse con otros paquetes de software) permite el registro de todos los procedimientos del laboratorio (extracción, amplificación, electroforesis, análisis de datos, etc.), así como el registro de muestras, el manejo de lotes, la comprobación de resultados, imprimir documentación, y la importación de perfiles a una base de datos, permitiendo además la implementación de medidas de seguridad como los privilegios de usuario [46].

Los sistemas LIMS van desde productos comerciales ya terminados hasta complejos sistemas que requieren de personal encargado del mantenimiento del mismo, en cualquiera de sus versiones permite pasar de un laboratorio con equipos aislados a un sistema completamente integrado, facilitando el trabajo diario mediante la opción de establecer listas de trabajo y permitiendo un completo registro de la cadena de custodia de las muestras; algunos laboratorios han planteado incluso su utilización en el análisis de datos: confirmación de los alelos consignados con doble ciego, concordancia de los marcadores de diferentes kits, y conversión de los resultados a otros formatos para su exportación a otras bases de datos o laboratorios [47].

LIMS permite integrar la logística, la transferencia de datos y la actividad propia del laboratorio en una cadena completa, desde la toma de la muestra hasta el ingreso del perfil de ADN obtenido en una base de datos, pudiendo incluso generar automáticamente informes si se produce una coincidencia [48]. Incluso en la implementación de nuevas técnicas como la secuenciación masiva (NGS), el sistema se muestra como una valiosa herramienta a la hora de crear lotes de muestras para analizar, controlar las librerías que se generan, exportar plantillas de análisis de resultados, así como la transferencia de los datos generados a una base de datos [49]. Incluso se han diseñado modificaciones para el trabajo con ADN antiguo, como es el caso de CASCADE, con el objetivo de manejar documentación y metadatos y mejorar la coordinación, la colaboración y el control de calidad de las muestras [50].

6.2. Control de documentos del sistema de gestión

Los documentos relacionados con el cumplimiento de la norma deben estar aprobados por la dirección del laboratorio antes de entrar en funcionamiento, debiendo ser revisados periódicamente y actualizados si es necesario, identificándose los cambios que se introduzcan, debiendo estar los documentos inequívocamente identificados en sus versiones actuales, previniendo la utilización de documentos obsoletos.

6.3. Control de registros

Además de las medidas de ciberseguridad propias de los registros que ya hemos visto, cabe preguntarse durante cuánto tiempo deben almacenarse, cuestión a determinar por el laboratorio siguiendo una coherencia para con sus obligaciones contractuales, no estableciéndose un periodo de tiempo mínimo o máximo.

6.4. Acciones para abordar riesgos y oportunidades

La norma establece el deber de considerar los riesgos y oportunidades intrínsecos al trabajo del laboratorio, identificando las oportunidades de mejora, las acciones correctivas ante una no conformidad, y las auditorías internas del sistema de gestión. En la **Tabla 8** se resumen los principales riesgos por niveles de un laboratorio forense, así como los mecanismos de control y tratamiento.

Tabla 8. Riesgos y acciones correctivas de un laboratorio de Genética forense (adaptado de Wilson, Gahan y Robertson [51])

Riesgo	Descripción	Acciones
Contaminación	Introducción de materia extraña en las muestras.	-Estandarización de métodos. -Plan de prevención, detección y tratamiento de contaminaciones.
Fallo de un análisis	Un ensayo no ha dado un resultado.	-Controles positivos
Falta de competencia	El analista no tiene la competencia necesaria para un análisis	-Ensayos de aptitud -Entrenamiento
Seguridad química y biológica	Exposición de los analistas a agentes químicos o biológicos	-ALARP (<i>As low as Reasonably Practice</i>)
Sesgos cognitivos	-Sesgo de confirmación (el analista se centra en las similitudes de las muestras y obvia las diferencias). -Sesgo de contexto (influencia de presiones externas) -Disonancia cognitiva (renuencia a aceptar información nueva y que contradice la previa).	-Validación y verificación de métodos. -Utilización de métodos objetivos. -No dar expectativas de resultados a los analistas. -Revisión por pares a ciegas de los resultados. -Código de conducta. -Ensayos de aptitud.
Gestión de proyectos	Los resultados no se entregan en el tiempo pactado.	Priorización de análisis.
Limitaciones de los ensayos	Falsos negativos y falsos positivos.	-Validación y verificación de métodos. -Reportar las limitaciones de las técnicas. -Muestras por duplicado.
Cadena de custodia	Mantenimiento inadecuado de la cadena de custodia.	LIMS o cualquier otro sistema que garantice la trazabilidad de la muestra.
Decisiones de la Justicia	-Condenas o exoneraciones erróneas. -Rotura de la cadena de custodia. -Dilatación de investigaciones.	-Implementación de un sistema de calidad. -Monitorización de no conformidades.

6.5. Mejora

El laboratorio debe comprometerse a mejorar continuamente la eficacia del sistema de calidad, identificando oportunidades de mejora a través de acciones correctivas que se hayan tenido que aplicar, sugerencias del personal del laboratorio, sugerencias de los clientes, revisiones periódicas del sistema, o auditorías internas o externas [52].

6.6. Acciones correctivas

El laboratorio debe contar y seguir una política y/o procedimiento para las no conformidades detectadas, debiendo documentar a su vez las acciones correctivas, incluyendo cuando sea posible la identificación de las causas de la no conformidad, las acciones correctivas y sus plazos, así como las medidas preventivas aplicadas para minimizar el riesgo de que se repitan [53].

6.7. Auditorías internas

Una auditoría es un proceso sistemático e independiente para evaluar objetivamente que se cumplen los criterios de la norma con un enfoque basado en la evidencia; las auditorías deben planificarse y realizarse de manera periódica (normalmente en un periodo anual), teniendo como objetivos verificar la conformidad del sistema de gestión con la norma, el cumplimiento de los requisitos, y determinar la efectividad del sistema, considerándose la información y las conclusiones obtenidas una fuente de mejora, poniéndose en marcha a partir del informe de auditoría las acciones correctivas que correspondan [54].

6.8. Revisiones por la dirección

La dirección del laboratorio debe revisar periódicamente el sistema de gestión para comprobar su correcto funcionamiento, siendo imperativo que anualmente se establezca una fecha para ello (aunque también pueden establecerse otros periodos), revisándose [55].

- Cambios y problemas internos y externos que afecten al laboratorio.
- Logro de objetivos.
- Posibles cambios en políticas y procedimientos.
- Resultados de auditorías internas.
- Quejas de clientes y sugerencias del personal del laboratorio.
- Adecuación de los recursos.
- Identificación de riesgos.
- Validez de resultados.
- Necesidades de entrenamiento del personal.

7. Conclusiones

La acreditación de un laboratorio forense bajo la norma ISO/IEC 17025:2017 se ha convertido en un estándar de calidad, no sólo del trabajo de rutina del mismo, sino también como requisito para volcar perfiles en bancos nacionales de ADN o para formar parte de redes internacionales.

La ISO/IEC 17025:2017 reúne los requisitos para la competencia de los laboratorio de ensayo y calibración, regulando aspectos como la imparcialidad y la confidencialidad, la estructura, los recursos, el proceso, y la gestión del laboratorio.

El sistema LIMS (*Laboratory Information Management System*) supone un poderoso aliado para garantizar la cadena de custodia y la trazabilidad de una muestra, así como una forma sencilla de disponer de registros de todas las actividades del laboratorio.

8. Referencias

- [1] Asociación Española de Normalización, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. (2017).
- [2] I.E. Dror, M.L. Pierce, ISO Standards Addressing Issues of Bias and Impartiality in Forensic Work, *J Forensic Sci.* 65 (2020) 800–808. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14265>.
- [3] M. Guillén, M.V. Lareu, C. Pestoni, A. Salas, Á. Carracedo, Ethical-legal problems of DNA databases in criminal investigations, *Journal of Medical Ethics.* (2000) 266–271. <http://dx.doi.org/10.1136/jme.26.4.266>.
- [4] B. Budowle, A. Sajantila, Revisiting informed consent in forensic genomics in light of current technologies and the times, *Int J Legal Med.* 137 (2023) 551–565. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-02947-w>.
- [5] Nešić, Lasar, Marić, Anđelko, Lončar, Milivoje, Implementation of the new standard ISO/IEC 17025:2017 and its impact on the quality of work in forensic laboratories, in: International Scientific Conference “Archibald Reiss Days” Thematic Conference Proceedings of International Significance, Academy of Criminalistic and Police Studies, Službeni glasnik, Belgrade, 2018: pp. 537–547. <https://core.ac.uk/download/pdf/196618488.pdf#page=535>.
- [6] American Society of Crime Laboratory Directors, Guidelines for Forensic Laboratory Management Practices, (1994). <https://www.ascl.org/docs/members/labmgtguide.pdf>.
- [7] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, The Guidance Document for the FBI Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing and DNA databasing laboratories, (2023). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_04e7c4147b3b4a00bda10ba1c9a874bd.pdf.
- [8] European Network of Forensic Science Institutes DNA Working Group, Quality assurance programme for DNA laboratories, (2010). <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2022/03/ENFSI-QA-Programme-v-16.pdf>.
- [9] Forensic Science Regulator, Forensic Science Regulator Guidance. The Control and Avoidance of Contamination in Laboratory Activities involving DNA Evidence Recovery Analysis, (2020). https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/914268/208_FSR_lab_anti_contam_V2.pdf.
- [10] T.L. Fulton, B. Shapiro, Setting Up an Ancient DNA Laboratory, in: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, 2019: pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9176-1_1.
- [11] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM Contamination Prevention and Detection Guidelines for Forensic DNA Laboratories, (2017). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_c4d4dbba84f1400a98eaa2e48f2bf291.pdf (accessed July 13, 2021).
- [12] UNODC United Nations Office on Drugs and Crime, Staff skill requirements and equipment recommendations for forensic science laboratories, (2011). https://www.unodc.org/documents/scientific/Ebook_STNAR_02Rev1_E.pdf.
- [13] ANSI National Accreditation Board, Accreditation Requirements for Forensic Testing and Calibration (2023), (2023). <https://anab.qualtraxcloud.com/ShowDocument.aspx?ID=12371>.
- [14] Fernández Oliva, Coro, Crespillo Márquez, Manuel C. (Ed.), Barrio Caballero, Pedro A. (Ed.), La calidad en los laboratorios de Genética Forense. La implantación de la Norma ISO/IEC 17025:2017, in: *Genética Forense. Del Laboratorio a Los Tribunales*, Díaz de Santos, Madrid, 2020.
- [15] Houston Forensic Science Center Quality Division, Houston Forensic Science Center Quality Manual, (2022). <https://hfsctx.gov/wp-content/uploads/2022/03/HFSC-Quality-Manual-effective-031522.pdf>.
- [16] Promega Corporation, Forensic-Grade Products for Human Identification: Preparing for ISO 18385 Requirements, (2014). <https://www.promega.es/-/media/files/resources/white-papers/forensic-grade-products-iso-18385-compliance.pdf?rev=c402ba296d1c418c890b27724bfb5895&la=en>.
- [17] Fischer, Ryan, The Importance of Contract Review, (2019). <https://blog.ansi.org/anab/importance-contract-review-iso-iec-17025/#gref>.
- [18] Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, CGA-ENAC-LEC Rev. 11 Julio 2022 Series 1 y 2. (2022). <https://www.enac.es/documents/7020/b7e24234-daba-4a62-9652-76eb7e96db30>.
- [19] Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Barcelona, Alcance de La Acreditación. (2023). <https://www.enac.es/documents/7020/43981c9f-74c6-4865-89de-53fb90b25acc>.
- [20] N. Morling, R.W. Allen, A. Carracedo, H. Geada, F. Guidet, C. Hallenberg, W. Martin, W.R. Mayr, B. Olaisen, V.L. Pascali, P.M. Schneider, Paternity Testing Commission of the International Society

- of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases, *Forensic Science International*. 129 (2002) 148–157. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00289-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00289-X).
- [21] American Academy of Forensic Sciences (AAFS), Standard for Internal Validation of Forensic DNA Analysis Methods, ANSI/ASB Standard 038, First Edition. (2020). https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/038_Std_e1.pdf.
- [22] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods, (2016). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_813b241e8944497e99b9c45b163b76bd.pdf.
- [23] European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) DNA Working Group, Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process, (2010). http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/minimum_validation_guidelines_in_dna_profiling_-_v2010_0.pdf.
- [24] G. Burgos, D. Ormasa, M. Camargo, G. Iturralde, J. Granda, Y. Posada, M. Sanchez, E. Tejera, M. Calvopiña, Assessment of method for buccal swab samples preservation in extreme environmental conditions for population genetics and forensic purposes, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 6 (2017) e460–e462. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.178>.
- [25] S. Ballou, M. Stolorow, M. Taylor, P.S. Bamberger, L. Brown, R. Brown, Y. Burney, D. Davenport, L. DePalma, S. Williams, C. Jones, R. Keaton, W. Kiley, J. Latta, M. Kline, K. Lanning, G. LaPorte, L.E. Ledray, R. Nagy, B.E. Ostrom, L. Schwind, S. Stoiloff, The biological evidence preservation handbook : best practices for evidence handlers ; technical working group on biological evidence preservation, National Institute of Standards and Technology, 2013. <https://doi.org/10.6028/NIST.IR.7928>.
- [26] New York City Office of Chief Medical Examiner, Forensic Biology Management System Manual, (2022). https://www.nyc.gov/assets/ocme/downloads/pdf/technical-manuals/forensic-biology-technical-manuals/management_system_manual_122222.pdf.
- [27] J.M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, San Diego, 2012.
- [28] S. Rand, M. Schürenkamp, B. Brinkmann, The GEDNAP (German DNA profiling group) blind trial concept, *International Journal of Legal Medicine*. 116 (2002) 199–206.
- [29] J.L. Peterson, G. Lin, M. Ho, Y. Chen, R.E. Gaensslen, The Feasibility of External Blind DNA Proficiency Testing. I. Background and Findings, *Journal of Forensic Science*. 48 (2003) 1–11.
- [30] K. Fernández, J. Gómez, J. García-Hirschfeld, E. Cubillo, C.S. de la Torre, G. Vallejo, Accreditation of the GHEP-ISFG proficiency test: One step forward to assure and improve quality, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 5 (2015) e515–e517. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.204>.
- [31] J.C. Álvarez, C. Haarkötter, M. Saiz, X. Gálvez, M.I. Medina-Lozano, J.A. Lorente, GITAD 2020: quality assurance test through 20 years of experience, *International Journal of Legal Medicine*. 136 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02802-4>.
- [32] Hohoff, C., Schnöink, K., Brinkmann, B., Schneider, Peter M., The GEDNAP (German DNA profiling group) proficiency testing system, (2013). <https://www.gednap.org/wp-content/uploads/2013/04/GEDNAP-Manual-E.pdf>.
- [33] European Network of Forensic Science Institutes, DNA Working Group, About ENFSI. (2020). <https://enfsi.eu/about-enfsi/structure/working-groups/dna/> (accessed March 15, 2021).
- [34] European Network of Forensic Science Institutes, Proficiency tests and collaborative exercises provided by ENFSI, (2018). <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2017/06/Proficiency-tests-and-collaborative-exercises-PT-CE-provided-by-ENFSI-01Oct2018.xlsx>.
- [35] National Institute of Standards and Technology, DNA & Biological Evidence, Forensic Science. (2019). <https://www.nist.gov/dna-biological-evidence> (accessed March 15, 2021).
- [36] National Institute of Standards and Technology, DNA Profiling Standard Reference Materials, Projects/Programs. (2016). <https://www.nist.gov/programs-projects/dna-profiling-standard-reference-materials> (accessed March 15, 2021).
- [37] Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN (CNUFADN), Recomendaciones sobre el informe pericial y la expresión de resultados en materia de análisis genéticos forenses, (2015). https://www.mjusticia.gob.es/es/ElMinisterio/OrganismosMinisterio/Documents/1292428320825-Recomendaciones_sobre_el_informe_pericial_y_la_expresion_de_resultados_en_materia_de_analisis_genet.PDF.
- [38] Long, Randy, How Laboratories Can Benefit from Complaints, (2020). <https://blog.ansi.org/anab/how-laboratories-can-benefit-from-complaints/#gref>.
- [39] A. Preuß-Prange, R. Renneberg, T. Schwark, M. Poetsch, E. Simeoni, N. von Wurmb-Schwark, The problem of DNA contamination in forensic case work—How to get rid of unwanted DNA?, *Forensic*

- Science International: Genetics Supplement Series. 2 (2009) 185–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2009.08.164>.
- [40] European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), DNA Contamination prevention guidelines, (2017). <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2017/09/DNA-contamination-prevention-guidelines-v2.pdf>.
- [41] M.-L. Kampmann, C. Børsting, N. Morling, Decrease DNA contamination in the laboratories, Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 6 (2017) e577–e578. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.223>.
- [42] National Institute of Standards and Technology, Data Integrity and Validation, (2007). <https://oa.mo.gov/sites/default/files/CC-DataIntegrityandValidation.pdf>.
- [43] Universidad de Granada, Aprobación de la Política de Seguridad de la Información de la Universidad de Granada, (2022). <https://secretariageneral.ugr.es/sites/webugr/secretariageneral/public/inline-files/BOUGR/186/Pol%C3%ADtica%20de%20Seguridad.pdf>.
- [44] Centro Criptológico Nacional, Implementación de seguridad en servidor de ficheros sobre Microsoft Windows Server 2019, Guía de Seguridad de Las TIC CCN-STIC-573A21. (2022). <https://www.ccn-cert.cni.es/pdf/guias/series-ccn-stic/guias-de-acceso-publico-ccn-stic/6663-ccn-stic-573a21-servidor-de-ficheros-en-ws2019/file.html>.
- [45] Centro Criptológico Nacional, Taxonomía de productos STIC - Anexo F.5: Copias de seguridad, Guía de Seguridad de Las TIC CCN-STIC 140. (2021). <https://www.ccn-cert.cni.es/series-ccn-stic/guias-de-acceso-publico-ccn-stic/3983-guia-140-anexo-f-5-copias-de-seguridad/file.html>.
- [46] Steinlechner, Martin, Parson, Walther, Automation and High Through-put for a DNA Database Laboratory: Development of a Laboratory Information Management System, Croatian Medical Journal. 42 (2001) 252–255.
- [47] B. Leclair, T. Scholl, Application of automation and information systems to forensic genetic specimen processing, Expert Review of Molecular Diagnostics. 5 (2005) 241–250. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.241>.
- [48] J. Hedman, L. Albinsson, C. Ansell, H. Tapper, O. Hansson, S. Holgersson, R. Ansell, A fast analysis system for forensic DNA reference samples, Forensic Science International: Genetics. 2 (2008) 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.12.011>.
- [49] P.A. Barrio, P. Martin, A. Alonso, LIMS configuration to fit new massively parallel sequencing workflows in forensic genetics, Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 6 (2017) e104–e106. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.040>.
- [50] L. Orlando, R. Allaby, P. Skoglund, C. Der Sarkissian, P.W. Stockhammer, M.C. Ávila-Arcos, Q. Fu, J. Krause, E. Willerslev, A.C. Stone, C. Warinner, Ancient DNA analysis, Nat Rev Methods Primers. 1 (2021) 1–26. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>.
- [51] L.E. Wilson, M.E. Gahan, C. Lennard, J. Robertson, Developing a strategic forensic science risk management system as a component of the forensic science system of systems, Australian Journal of Forensic Sciences. 52 (2020) 208–221. <https://doi.org/10.1080/00450618.2018.1510032>.
- [52] Channel, Kermit B., Arkansas State Crime Laboratory Quality Manual, (2021). <https://www.dps.arkansas.gov/wp-content/uploads/2021/10/ASCL-DOC-01-Quality-Manual-1709-24.pdf>.
- [53] Federal Bureau of Investigation, Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories, (2020). https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_d73afdd0007c4ed6a0e7e2ffbd6c4eb8.pdf.
- [54] Morillas Bravo, P. P., Guía para la aplicación de UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, AENOR ediciones, Madrid, 2019.
- [55] Mehta, Bob, Implementing ISO/IEC 17025:2017, Second Edition, ASQ Quality Press, Milwaukee, Wisconsin, 2019.

Conclusiones



Una vez que se cambia de punto de vista, eso mismo que era tan condenatorio se convierte en pista para descubrir la verdad.

Sherlock Holmes, El puente de Thor.



Conclusiones

Primera. En la comparativa entre hueso petroso, dientes, fémur y tibia, se ha observado que del primero se obtiene una mayor cantidad de ADN, siendo junto con los dientes, en términos generales, el sustrato idóneo para la obtención de un perfil genético.

Segunda. En la comparativa entre los métodos de extracción orgánica, sílice, y partículas magnéticas, se ha observado que la extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico es la que más ADN obtiene y la que mejores perfiles genéticos genera.

Tercera. En la comparativa entre los kits comerciales de cuantificación, se ha observado que el kit InnoQuant® HY es el más sensible, y por tanto el idóneo para la cuantificación de muestras mínimas.

Cuarta. En la comparativa entre los kits comerciales de STRs autosómicos no se han observado diferencias significativas que justifiquen la elección de uno sobre otro. En la comparativa entre kits comerciales de Y-STRs, se ha observado que PowerPlex® Y23 recupera un mayor número de marcadores reportables. En la comparativa entre los kits InnoTyper® 21 (INNULs) y el kit Globalfiler™ (auSTRs), si bien el primero obtiene más marcadores para la misma muestra, tiene un menor poder de discriminación, lo que lo constituye como análisis complementario.

Quinta. Las herramientas de secuenciación masiva de análisis de ADN antiguo muestran que las muestras analizadas, pese a ser tratadas como forenses, reúnen las características de degradación y daño molecular propias del ADN antiguo.

Conclusions

First. In the comparison among petrous bone, teeth, femur, and tibia, it has been observed that petrous bone yields a higher quantity of DNA, making it, along with teeth, generally the ideal substrate for obtaining a genetic profile.

Second. In the comparison among organic extraction, silica, and magnetic particle DNA extraction methods, it has been observed that DNA extraction with phenol/chloroform/isoamyl alcohol obtains the best DNA yield and generates the best genetic profiles.

Third. In the comparison among qPCR commercial kits, it has been observed that the InnoQuant[®] HY kit is the most sensitive and, therefore, suitable for quantifying minimal samples.

Fourth. In the comparison among autosomal STRs commercial kits, no significant differences have been observed to justify the choice of one over another. In the comparison among Y-STRs commercial kits, it has been observed that PowerPlex[®] Y23 recovers a greater number of reportable markers. In the comparison between InnoTyper[®] 21 (INNULs) and the Globalfiler[™] kit (auSTRs), although the former obtains more markers for the same sample, it has lower discriminatory power.

Fifth. Massive sequencing tools for ancient DNA analysis show that the analysed samples, despite being treated as forensic, exhibit characteristics of degradation and molecular damage typical of ancient DNA.

A comparison between petrous bone and tooth, femur and tibia DNA analysis from degraded skeletal remains

Christian Haarkötter  | Diana C. Vinueza-Espinosa | Xiomara Gálvez |
 María Saiz | María Isabel Medina-Lozano | José Antonio Lorente  |
 Juan Carlos Álvarez

Laboratory of Genetic Identification,
 Department of Legal Medicine,
 Toxicology and Physical Anthropology,
 Faculty of Medicine, University of
 Granada, Granada, Spain

Correspondence

Diana C. Vinueza-Espinosa, Laboratory of
 Genetic Identification, Department of
 Legal Medicine, Toxicology and Physical
 Anthropology, Faculty of Medicine,
 University of Granada, Granada, Spain.
 Email: dvinuezaespinosa@ugr.es

Color online: See article online to view
 Figures 1–5 in color.

Abstract

Skeletal remains are the only biological material that remains after long periods; however, environmental conditions such as temperature, humidity, and pH affect DNA preservation, turning skeletal remains into a challenging sample for DNA laboratories. Sample selection is a key factor, and femur and tooth have been traditionally recommended as the best substrate of genetic material. Recently, petrous bone (cochlear area) has been suggested as a better option due to its DNA yield. This research aims to evaluate the efficiency of petrous bone compared to other cranium samples (tooth) and postcranial long bones (femur and tibia). A total amount of 88 samples were selected from 38 different individuals. The samples were extracted by using an organic extraction protocol, DNA quantification by Quantifiler Trio kit and amplified with GlobalFiler kit. Results show that petrous bone outperforms other bone remains in quantification data, yielding 15–30 times more DNA than the others. DNA profile data presented likeness between petrous bone and tooth regarding detected alleles; however, the amount of DNA extracted in petrous bones allowed us to obtain more informative DNA profiles with superior quality. In conclusion, petrous bone or teeth sampling is recommended if DNA typing is going to be performed with environmentally degraded skeletal remains.

KEYWORDS

degraded DNA, forensic genetics, human remains, petrous bone, skeletal remains

1 | INTRODUCTION

DNA typing from skeletal remains is a valuable resource in forensic, archaeological, and ancient DNA studies since

Abbreviations: AT, analytical threshold; CQV, coefficient of quartile variation; RFU, relative fluorescence units; ST, stochastic threshold.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2023 The Authors. Electrophoresis published by Wiley-VCH GmbH.

bones and teeth are the only biological material that remains after long periods of decaying and environmental exposure [1]. The environmental conditions such as high temperature [2], humidity [3], salinity, and low pH [4] are factors that affects DNA preservation [5], resulting in molecular damage and degradation in small pieces hindering its recovery in laboratory. In this context, the use of



A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains



Christian Haarkötter, Xiomara Gálvez^{*}, Diana C. Vinueza-Espinosa, María Isabel Medina-Lozano, María Saiz, José Antonio Lorente, Juan Carlos Álvarez

Laboratory of Genetic Identification, Department of Legal Medicine, Toxicology and Physical Anthropology, Faculty of Medicine, University of Granada, Avenida de la Investigación 11 Torre C Planta 9, 18016 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2023

Received in revised form 19 April 2023

Accepted 12 May 2023

Available online 15 May 2023

Keywords:

Degraded DNA
DNA extraction
Human remains
Skeletal remains
STR typing

ABSTRACT

Extracting DNA from degraded human remains poses a challenge for any forensic genetics laboratory, as it requires efficient high-throughput methods. While little research has compared different techniques, silica in suspension has been identified in the literature as the best method for recovering small fragments, which are often present in these types of samples. In this study, we tested five DNA extraction protocols on 25 different degraded skeletal remains. Including the humerus, ulna, tibia, femur, and petrous bone. The five protocols were organic extraction by phenol/chloroform/isoamyl alcohol, silica in suspension, High Pure Nucleic Acid Large Volume silica columns (Roche), InnoXtract™ Bone (InnoGenomics), and PrepFiler™ BTA with AutoMate™ Express robot (ThermoFisher). We analysed five DNA quantification parameters (small human target quantity, large human target quantity, human male target quantity, degradation index, and internal PCR control threshold), and five DNA profile parameters (number of alleles with peak height higher than analytic and stochastic threshold, average relative fluorescence units (RFU), heterozygous balance, and number of reportable loci) were analysed. Our results suggest that organic extraction by phenol/chloroform/isoamyl alcohol was the best performing method in terms of both quantification and DNA profile results. However, Roche silica columns were found to be the most efficient method.

© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Forensic DNA typing plays a key role in the identification of human remains in various contexts such as terrorism, organized crime, mass fatality incidents or mass graves. The Regional Government of Andalusia (Spain) has been making efforts since 2017 to identify the victims of the Spanish Civil War (1936–1939) and post-war period, estimating 45,569 victims in 709 mass graves [1]. The laboratory's mission is to perform the DNA analyses from both victims and family members, so far 2335 skeletal remains (mostly femur and tooth) and 1776 family members buccal swabs up to date. Conventional approaches are insufficient to handle this high number of samples, so high-throughput methods are required in such scenarios [2].

The DNA extraction protocol is a crucial element that can be chosen and modified by the analyst to obtain the best possible quality and quantity of extracted DNA. Since critical skeletal remains DNA is likely to be damaged, forensic DNA extraction protocols have

to be adapted to recover the most short fragments [3]. Total demineralization was proposed as the best method for degraded human remains DNA analysis [4], while silica extraction was concurrently stated as the best method for ancient DNA analyses [5]. Since both extraction protocols are arduous, automated DNA extraction systems have been proposed for old skeletal remains analysis with accurate results [6].

In general terms, the literature has pointed out better yields with total demineralization protocols. Still, silica is especially efficient for short DNA fragments recovery, yet there are many factors to consider, such as: lysis buffer composition, the amount of bone powder input, the lysis buffer and bone powder ratio, or incubation temperature and duration [7]. A meta-analysis [8] found that magnetic beads methods (EZ1® DNA Investigator® and PrepFiler™ BTA) were the most widely used methods by Forensic DNA laboratories (ancient DNA studies were excluded), followed by organic extraction and silica. Higher DNA profiling success was observed with magnetic beads/resin based methods, as well as in those methods that incorporated a demineralization step.

Not many comparisons of DNA extraction methods for critical human remains have been published in the literature. Silica adsorption have been pointed out as the best method in Pleistocene

^{*} Corresponding author.

E-mail address: xgales@ugr.es (X. Gálvez).



Performance comparison of four qPCR and three autosomal STR commercial kits from degraded skeletal remains

Christian Haarkötter, María Saiz^{*}, Xiomara Gálvez, Diana C. Vinueza-Espinosa, María Isabel Medina-Lozano, José Antonio Lorente, Juan Carlos Álvarez

University of Granada, Laboratory of Genetic Identification. Department of Legal Medicine, Toxicology and Physical Anthropology, Faculty of Medicine, Avd. de la Investigación 11– 18016 - PTS, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Critical samples
DNA Quantification
Skeletal remains
STR Analysis
qPCR

ABSTRACT

This research evaluates the current DNA quantification (Quantifiler™ Trio, PowerQuant®, Investigator® Quantiplex® Pro and InnoQuant® HY Fast) and autosomal STRs amplification kits (GlobalFiler™, PowerPlex® Fusion 6 C, Investigator® 24Plex QS) using 62 degraded skeletal remains from armed conflicts (petrous bone, femur, tibia, and tooth) with several parameters (autosomal small, large, and male target, degradation index, probability of degradation, number of alleles above analytical threshold, number of alleles above stochastic threshold, RFU, peak height ratio, number of reportable loci). The best qPCR/autosomal STRs amplification tandem was determined by comparing quantification results by a DNA quantity estimation based on sample average RFU. InnoQuant® HY Fast was the most sensitive kit, and no significative differences were observed among amplification kits; however, Investigator® 24 Plex QS was found to be the most sensitive in our samples. That is why InnoQuant™ and Investigator® 24Plex QS were determined to be the best tandem.

1. Introduction

Skeletal remains DNA analysis is challenging because of low quantity, fragmentation and molecular damage [1]. Environmental conditions such as high temperature [2], humidity [3], salinity, and low pH [4] make sampling and extraction strategies crucial to achieve good results.

Once the DNA extract is obtained, quantification become an informative step in compromised skeletal remains analysis. This is because human DNA quantity, degradation and the presence of inhibitors are assessed in one quantitative PCR assay [5]. Commercial kits usually contain four amplification targets: a small one, a large one (so that degradation index can be assessed with those targets ratio), a male target (so that the determination of sex can be obtained) and an internal PCR fragment (IPC) that allow to assess amplification failure due to the presence of PCR inhibitors [6]; that is the case of the currently available qPCR commercial kits Quantifiler® Trio (ThermoFisher), PowerQuant® System (Promega), Investigator® Quantiplex® Pro and InnoQuant® HY, all of them utilizing the same four targets system described above, being different in the large target and IPC amplicon size: Investigator® Quantiplex® Pro has the longest large target (353 bp), while the others

range from 207 bp (InnoQuant® HY) to 294 bp (PowerQuant®). Quantiplex® Pro and PowerQuant® have the longest IPC amplicons (~453 bp). Other differences are: IPC efficiency reflection in the quality sensors of the autosomal STR kit Investigator® 24Plex, two male targets in PowerQuant® and Quantiplex® Pro that minimize copy number related variations in results, and InnoQuant® HY targeting *Alu* retrotransposable elements in both small and large autosomal targets. All of them have a similar small human and male target amplicon size [7]. There is little comparison of the performance of currently available commercial kits or their relationship with amplification kits in the literature [7,8].

Autosomal STR typing is a well-established method in Forensic Genetics which uses relatively short PCR products (100–450 bp) and has a high power of discrimination due to the multiplex capacity of the currently available commercial kits [9]. The markers have been recently expanded due to the addition of more channels to CE devices which allowed to incorporate more fluorochromes leading to new markers addition and shorter amplicons. Highly degraded DNA is present in low quantities, it is fragmented and contains miscoding lesions, leading to amplification failure [10]. This is the reason why shorter markers are amplified more efficiently than the largest ones [11], resulting in a

^{*} Corresponding author.

E-mail address: msaiz@ugr.es (M. Saiz).