



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

El control de contaminación en laboratorio de genética forense

Autor: Esther Lechuga Morillas

Grado: Biología

Fecha: 07/06/2024



CREA



Trabajo Fin de Grado

El control de contaminación en laboratorio de genética forense

Alumno: Esther Lechuga Morillas

Jaén, junio, 2024

CONTENIDO:

1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1. Genética forense.	2
1.2. ADN como molécula de investigación en la identificación genética humana.	3
1.2.1 ADN nuclear.	3
1.2.2 ADN mitocondrial.	5
1.3. Metodologías basadas en el análisis del ADN para identificación genética humana: Análisis de Fragmentos y Secuenciación, Electroforesis Capilar para STRs y NGS.	7
1.4. Aplicaciones de los análisis genéticos para identificación humana.	10
1.5. Laboratorio de Identificación Genética de Granada.	12
1.5.1 Características del laboratorio de extracción de restos óseos.	15
1.5.2 Identificación genética a partir de restos óseos.	15
1.6. Gestión de la calidad: ISO 17025.	18
1.7. Gestión de la contaminación en el laboratorio de genética forense.	19
1.7.1 Prevención.	20
1.7.2 Detección de contaminación.	23
2. OBJETIVOS.	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	24
3.1. Recogida de muestras para control de contaminación.	24
3.2. Preparación de las muestras.	25
3.3. Registro de hisopado de superficies.	26
3.4. Extracción del ADN.	28
3.5. Amplificación por PCR.	30
3.6. Análisis de los STRs autosómicos mediante Electroforesis Capilar.	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
4.1. Resultados análisis 16/02/2024.	34
4.2. Resultados análisis 19/03/2024.	36
4.3. Resultados análisis 16/04/2024.	38
4.4. Resultados análisis 20/05/2024.	40
5. CONCLUSIONES.	41
6. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCIAS.	43
6.1. Leyes	50

RESUMEN:

La contaminación de muestras con ADN exógeno es uno de los grandes problemas que se dan en la genética forense a la hora de la creación de perfiles genéticos para la identificación de víctimas que se encuentran en fosas desde hace décadas. Esto es debido a la dificultad que existe en la prevención de la contaminación del ADN de las muestras, en su recogida y posterior análisis, ya que presentan un alto grado de degradación. Es por ello que en este trabajo se ejecutaron diversos procedimientos para determinar si el control de la contaminación se realiza correctamente en el laboratorio de muestras mínimas del Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada en el cual se lleva a cabo un proyecto que consiste en el análisis de restos óseos de la Guerra Civil Española y la Dictadura franquista posterior. Entre estos métodos se incluyen: la toma de muestras a través de hisopos bucales, extracción automatizada de ADN, amplificación por PCR y análisis de los STRs autosómicos mediante electroforesis capilar, siendo los resultados presentados en forma de electroferogramas.

Palabras clave: ADN antiguo, ADN mitocondrial, microsatélites (STRs), genética forense.

ABSTRACT:

Sample contamination with exogenous DNA is one of the biggest problems that arise in forensic genetics when creating genetic profiles for the identification of victims who have been in graves for decades. This is due to the difficulty in preventing contamination of the samples, during their collection or subsequent analysis, since they present a high degree of degradation. In this work various procedures were executed to determine if the contamination control is carried out correctly in the minimum sample laboratory of the Genetic Identification Laboratory of the University of Granada where a Project in the analysis of human bones remains from the Spanish Civil War and the subsequent Franco Dictatorship is being investigated. These methods include: sampling through buccal swabs, automated DNA extraction, PCR amplification and analysis of autosomal STRs by capillary electrophoresis with the results being presented in the form of electropherograms.

Keywords: ancient DNA, mitochondrial DNA, microsatellites (STRs), forensic genetics.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Genética forense:

La genética es la rama de la Biología en la cual se estudian los mecanismos de la herencia, siendo el ácido desoxirribonucleico (ADN) la molécula portadora de la misma. Está conformada por: dos hebras complementarias y antiparalelas compuestas por desoxirribonucleótidos, constituidos por un azúcar/pentosa de cinco carbonos (desoxirribosa) en la posición central, un grupo fosfato/ácido fosfórico y las bases nucleotídicas (adenina, guanina, citosina y timina) que presentan una estructura anular (*Watson y Crick, 1953*). El ADN, contiene una secuencia concreta de nucleótidos que conforma el genoma, conjunto de genes que contienen toda la información necesaria para la formación de un individuo completo. Esta molécula se encuentra en el interior del núcleo celular y su organización estructural puede adquirir un grado mayor de complejidad en determinados momentos del ciclo celular, cómo durante la mitosis. En ese periodo se condensa y compacta a través de la asociación con diferentes grupos de proteínas hasta dar lugar a los cromosomas, estructuras organizadas visibles al microscopio (Figura 1.1).

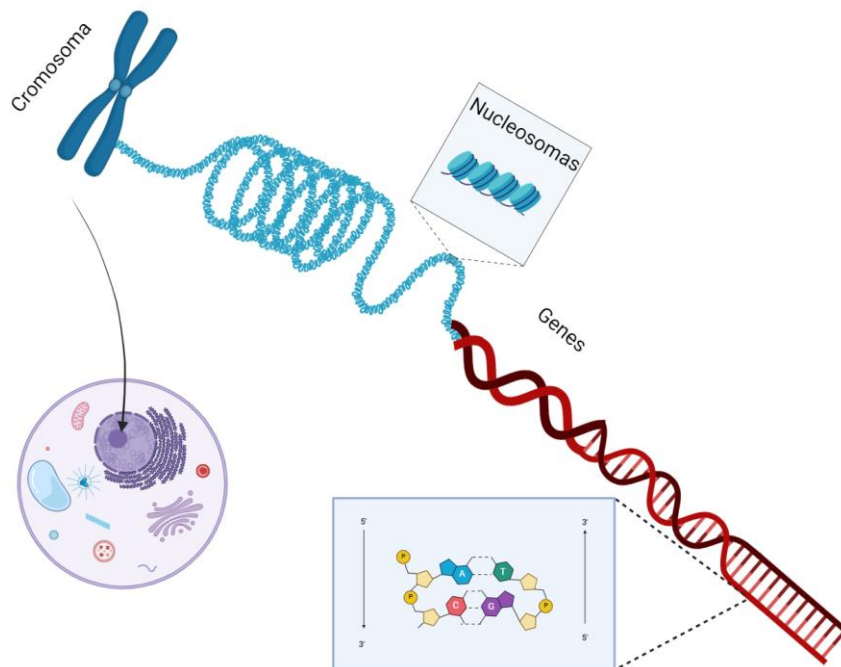


Figura 1.1: Estructura del material genético de una célula (elaboración propia, creado con Biorender).

En el ámbito forense, lo que se busca con el empleo de los análisis genéticos es: (I) la identificación de víctimas de desastres masivos (a partir de la comparación

de los perfiles genéticos de las víctimas con aquellos pertenecientes a los familiares), (II) la determinación de presuntos culpables en casos policiales o (III) la realización de pruebas de paternidad.

Los desastres masivos, en los cuales muere una gran cantidad de personas, pueden ser debidos a: fenómenos naturales (como los terremotos, tsunamis...), terrorismo, guerras y otros sucesos. Todos ellos producen un impacto en el cuerpo, el cual variará en función del tipo de proceso y de la magnitud del mismo, afectando así a la integridad del material genético y a la posterior identificación (*Crespillo Márquez et al., 2023*).

1.2. ADN como molécula de investigación en la identificación genética humana:

Para la identificación genética humana en los casos expuestos, es necesario el conocimiento de la organización del genoma humano y su variabilidad. El genoma humano haploide presenta un tamaño de 3'2 gigabases (Gb) (*Ciencia del genoma, n.d.*). En este, hay regiones codificantes (aquellas que presentan información para la formación de proteínas) y no codificantes (cuya información no es útil, aparentemente). Sin embargo, estas últimas, ya que son altamente polimórficas son de gran importancia a la hora de la identificación humana.

En 1985, Alec J. Jeffreys descubrió el primer locus polimórfico, introduciendo así el método de la “huella genética”. Lo cual supuso el inicio de la investigación de los polimorfismos (comentados a continuación) con fines de identificación genética humana. Además, cabe destacar la presencia de dos tipos de ADN en los individuos según su localización subcelular: ADN nuclear y ADN mitocondrial.

1.2.1 ADN nuclear:

En el núcleo celular se encuentra el ADN nuclear, cuya secuencia se divide en:

- Regiones codificantes: Se estima que existen en torno a 22.000 genes codificantes a proteína en el genoma humano (*Pertea y Salzberg, 2010*), representando el 1% del total del genoma, y que tendrán una función concreta en ámbitos como el desarrollo, metabolismo, regulación, etcétera.

- Regiones no codificantes: Son el 99% restante de secuencia del ADN. Pueden ser: secuencias funcionales, que no dan lugar a la creación de proteínas, siendo los ácidos ribonucleicos (ARNs) no codificantes un buen ejemplo; repeticiones cortas en tándem que conforman la heterocromatina centromérica (ADN satélite), pseudogenes, polimorfismos de nucleótido único (SNPs), repeticiones en tándem de número variable (VNTR), ADN microsatélite (STRs) o secuencias derivadas de transposones y retrotransposones.

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) son polimorfismos de un único nucleótido que pueden ser debidos a errores durante la replicación del ADN o durante su reparación en la línea germinal y que, posteriormente, pasarán a la descendencia. Existen millones de estos repartidos por todo el genoma humano y, algunos de ellos, representan variaciones significativas entre poblaciones humanas. El impacto de estas mutaciones puede ser evidente si provocan cambios en regiones codificantes que produzcan modificaciones en proteínas, no obstante, la mayor parte de estos se encuentran en regiones no codificantes. Los SNPs, aunque no produzcan alteraciones en las proteínas tienen una enorme utilidad en los estudios genómicos de comparación o evolutivos ya que funcionan como marcadores físicos (*Kim y Misra, 2007*).

Por otro lado, los STRs (Short Tandem Repeat) son secuencias cortas (2-5 pares de bases (pb)) en tándem de ADN no codificante que forman parte del ADN microsatélite. La composición de las repeticiones puede ser: di- (si están compuestos por dos bases, por ejemplo, TA), tri- (tres bases, por ejemplo, ATC) o tetranucleótidos (cuatro bases, por ejemplo, ATCG). Siendo estos últimos los elegidos, principalmente, para la identificación genética. Dichas bases, se repiten un número variable de veces, produciendo alelos diferentes en las poblaciones humanas, cada uno de ellos definido por el número de repeticiones que lleva (Figura 1.2) (*Gettings et al., 2015*).

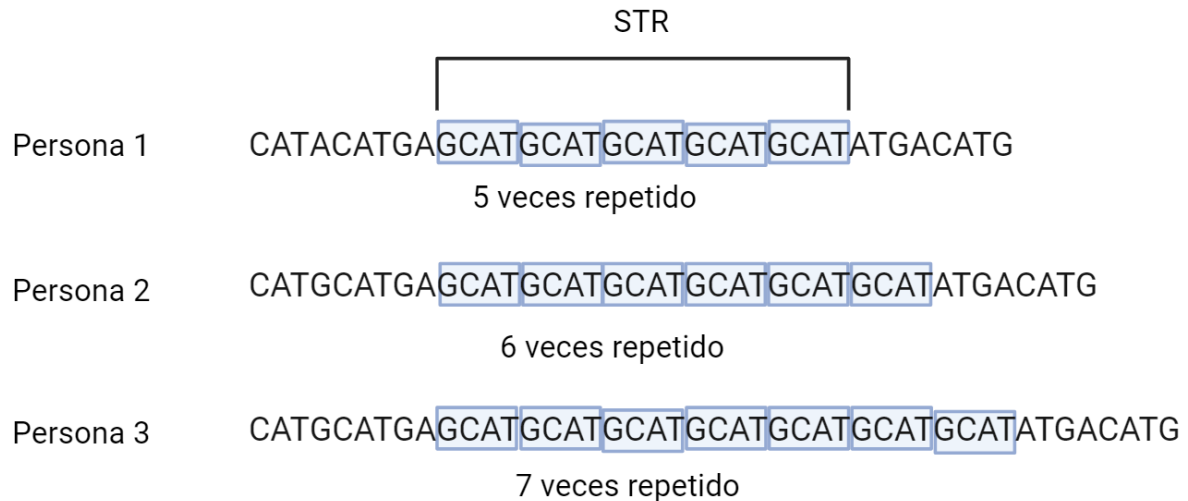


Figura 1.2: Repeticiones en STRs (elaboración propia, creado con Biorender).

Como he mencionado anteriormente, en ciertos momentos el ADN se condensa dando lugar a los cromosomas. En la especie humana existen 22 pares de cromosomas autosómicos, siendo un miembro del par de origen materno y otro de origen paterno, y 2 cromosomas sexuales, todos ellos por parejas de homólogos. Sin embargo, es necesaria la reducción del número de cromosomas a la mitad en los gametos parentales para el mantenimiento de la herencia en todos los individuos de una especie, mediante la meiosis. Por otro lado, en el transcurso de la misma, se da la recombinación o entrecruzamiento cromosómico, debido al intercambio de secuencia de ADN entre cromosomas homólogos bivalentes por uno o más puntos denominados quiasmas. Este es uno de los procesos que, junto con la mutación, permite la variación genética entre individuos de la misma especie debido a la permuta de información. Por lo que el análisis de los cromosomas sexuales puede ser de utilidad a la hora de la identificación genética.

1.2.2 ADN mitocondrial:

En las células existen orgánulos tales como las mitocondrias, las cuales realizan un papel fundamental en su mantenimiento. Estas presentan su propio genoma, una molécula de ADN circular con una extensión de alrededor de 16'5 Kpb (Figura 1.3). El cual contiene 37 genes, de los cuales 13 codifican para proteínas (Falagán et al., 2012). Las hebras del ADN presentan una distribución asimétrica en su contenido en guaninas y citosinas, lo cual produce la formación de una hebra pesada y otra ligera. Por otro lado, contiene una región no codificante denominada

control o D-loop, que presenta alrededor de unas 1000 pb, cuya función es actuar como promotor de las hebras pesada y ligera, además de contener elementos esenciales de transcripción y replicación (Sbisà *et al.*, 1997). Dentro de esta se encuentran las variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial entre personas, es en gran medida polimórfica y contiene dos regiones hipervariables, denominadas HV (Lareu y Salas, 2000). Es menester destacar que el número de copias de ADN dentro de una única mitocondria varía de 2 a 10 (Falagán *et al.*, 2012). Además, se trata de un orgánulo realmente vulnerable a las mutaciones debido a que su genoma no presenta sistemas de reparación del ADN, ni protección en las histonas, así como existen altos niveles de especies de oxígeno reactivas en él. Estos cambios conllevan a la heteroplasmia, fenómeno que consiste en la presencia de diferentes secuencias de ADN mitocondrial en una misma célula o individuo, característica que puede influenciar en: el metabolismo, la apoptosis, la homeostasis del calcio, a la cantidad de especies reactivas de oxígeno que hay presentes en una célula, entre otros. A pesar de que la mayor parte de los mamíferos son homoplasmáticos, las mutaciones puntuales heteroplasmáticas en la región control del ADN mitocondrial no son raras de vislumbrar.

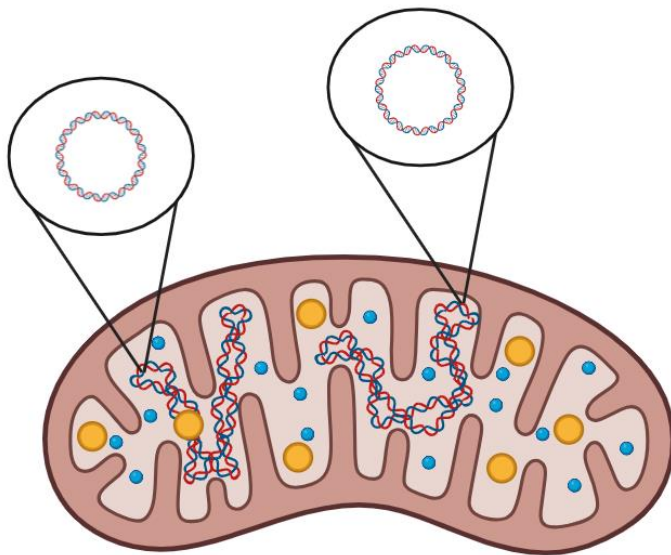


Figura 1.3: Estructura de las mitocondrias (elaboración propia, creado con Biorender). En color naranja se representan los gránulos y en color azul los ribosomas.

La utilidad del estudio del ADN mitocondrial reside en: su mayor resistencia a la degradación comparado con el nuclear (Crespo Márquez *et al.*, 2023), en el amplio campo de métodos para su enriquecimiento y en la vía de transmisión. Así, se

transmite de generación en generación de modo monoparental, por vía materna, dándonos la posibilidad de estudiar al linaje familiar por esta rama. Todo esto hace que su secuenciación y análisis sea de gran interés en genética forense (*Peyrégne y Prüfer, 2020*). Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes como son:

- Alto ratio de mutación debido en parte a las rutas metabólicas oxidativas mitocondriales que pueden generar diversas consecuencias como pueden ser: daño por radicales libres, ausencia de histonas y menor eficiencia en la reparación de los errores de replicación.
- Heteroplasmia de la cual he hablado anteriormente y para cuya explicación se ha formado la hipótesis del cuello de botella, el cual dice que en algún estadio de la oogénesis o de la embriogénesis se decide el genotipo citoplasmático de la siguiente generación de moléculas de ADN mitocondrial.
- La presencia de segmentos homopoliméricos, es decir, de nucleótidos idénticos seguidos, llegando a provocar problemas en el análisis de la secuencia.
- No permite la discriminación de individuos de un mismo grupo familiar por vía materna.

1.3. Metodologías basadas en el análisis del ADN para identificación genética humana:

La presencia de diversos métodos para la identificación de personas hace que las investigaciones puedan llevarse a cabo por diferentes caminos, al igual que nos permite la obtención de mayores datos genéticos. Centrándonos en la utilización del ADN nuclear para estos procesos, encontramos una serie de marcadores genéticos, secuencias de ADN con una ubicación concreta en un cromosoma y cuya herencia es rastreable, como los SNPs y los STRs (autosómicos y del cromosoma Y).

En la actualidad para la caracterización de los SNPs se puede utilizar la secuenciación por método Sanger (Figura 1.4) o, más recientemente, se han incorporado los métodos basados en secuenciación por Secuenciación de Nueva Generación (NGS) y enriquecimiento previo (ejemplo kit “GeneRead™ DNAseq”).

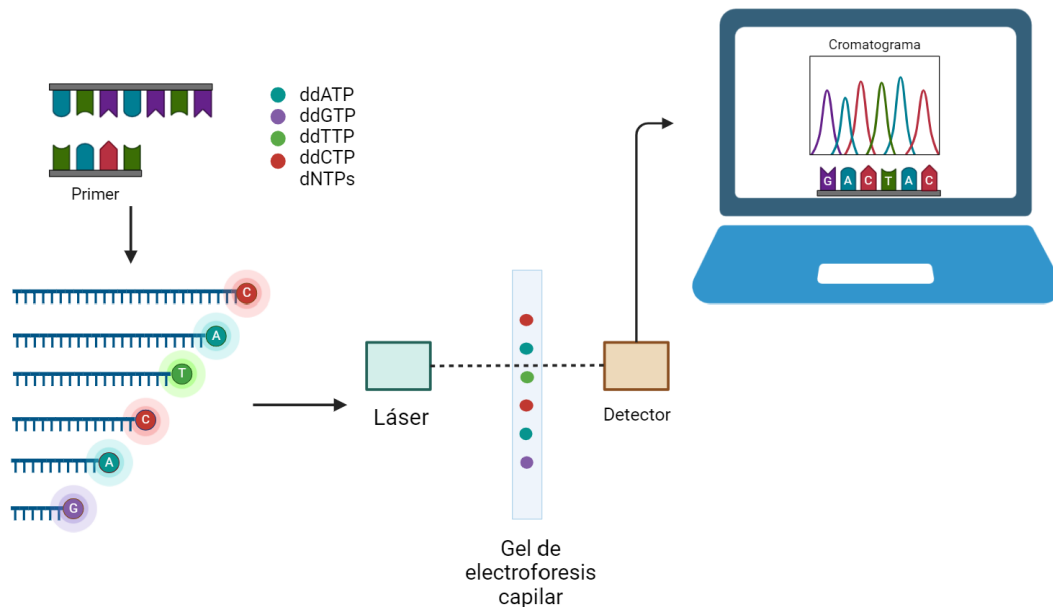


Figura 1.4: Secuenciación Sanger (elaboración propia, creado con Biorender).

Por otro lado, los STRs se encuentran flanqueados por secuencias únicas, lo cual nos permite realizar el genotipado de marcadores individuales. La presencia de una alta variedad de STRs nos permite establecer identificaciones con ramas familiares más allá de padres, hermanos o primos. Además, la determinación del sexo es uno de los factores más importantes en la identificación de personas. Para ello, existen diversos procedimientos como son: la utilización de un kit de amelogenina (AML), con el cual se puede observar una delección de 6 pb en un intrón para la copia del gen de la AML-X respecto al gen AML-Y, utilizado para el diagnóstico genético del sexo desde la última década del siglo XX (*Francès et al., 2008*). Sin embargo, se procedió al estudio de otros métodos basados en otros marcadores del cromosoma Y como son: la región SRY y/o los STRs del cromosoma Y, estos son específicos del sexo masculino por lo que nos permite la determinación del sexo de la víctima, así como la reconstrucción de líneas familiares entre individuos machos (*Yang et al., 2014*). No obstante, presenta un menor poder de discriminación ya que al estar incluido en la región no recombinante del cromosoma Y conforman un único haplotipo con herencia patrilineal, sin apenas cambios en su secuencia, lo que no permite la diferenciación de varones dentro de una misma familia (*Diegoli, 2015*). Además, la especificación del sexo se puede ver afectada por diversos contratiempos, como en casos de quimerismo donde tejidos o células de una persona pueden contener dos tipos de ADN distintos, el microquimerismo que ocurre cuando una mujer se encuentra

embarazada de un niño, condiciones intersexuales, transexualidad o en casos donde existe aneuploidía en los cromosomas sexuales (Laverde, 2013). La caracterización tanto de los STRs autosómicos como los STRs del cromosoma Y se produce con una amplificación del ADN por PCR (Polimerase Chain Reaction) multiplex con los kits: “PowerPlexY23” (Promega Corporation, Wisconsin) o “YFiller Plus” (Life Technologies, California) (Ludeman et al., 2018; Purps et al., 2014). Estos kits permiten la amplificación simultánea de múltiples STRs (8-12) y contienen uno de los dos cebadores marcados con fluorescencia. De tal modo que, con una posterior secuenciación mediante electroforesis capilar (Figura 1.5), la cual consiste en la separación de los fragmentos de ADN producidos, de acuerdo a su carga y/o tamaño, podemos inferir el tamaño exacto en pb para todos los alelos de una muestra concreta. El resultado de este procedimiento se visualiza mediante electroferogramas. En estos, el eje X presenta las unidades de fluorescencia relativa (RFU), las cuales se correlacionan con la cantidad de ADN de un tamaño determinado. Mientras que el eje Y representa el tamaño del ADN en pb.

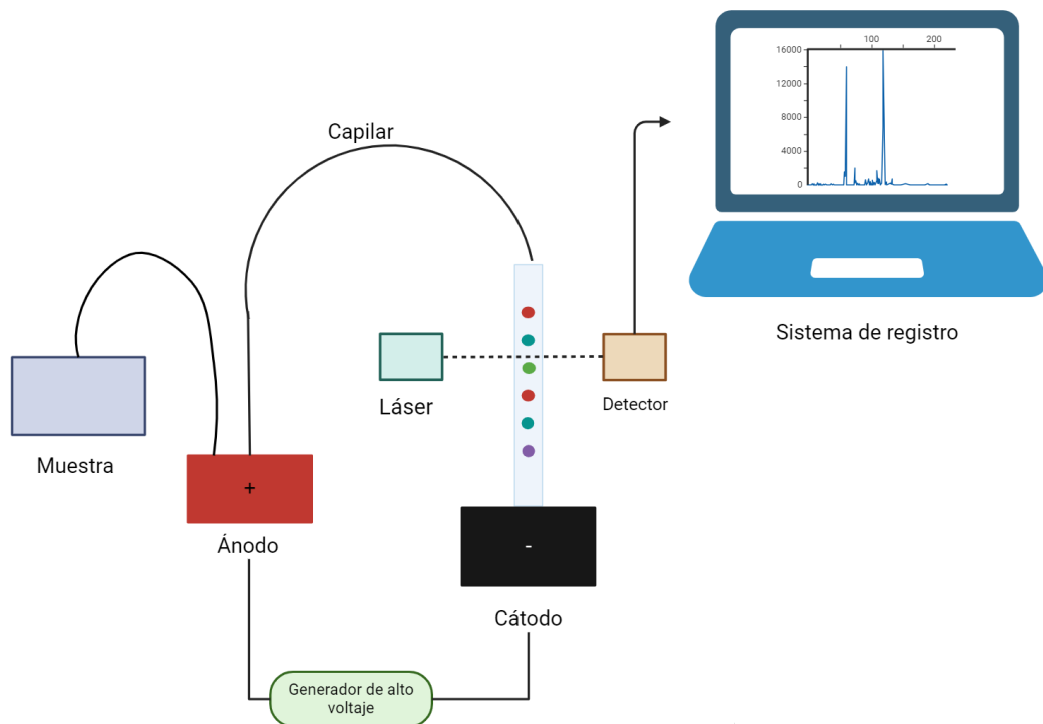


Figura 1.5: Electroforesis capilar (elaboración propia, creado con Biorender).

En el caso del ADN mitocondrial, su caracterización se puede hacer mediante la secuenciación de las regiones hipervariables (HVs), para obtener la secuencia concreta y poder afinar al máximo el haplotipo. Aunque existen otros métodos como

son la detección de SNPs (*Adachi et al., 2014*) o la secuenciación Sanger. Sin embargo, recientemente, se está utilizando la NGS gracias al bajo coste, a su nivel de cuantificación de las heteroplasmas y a la habilidad de detectar mutaciones heteroplasmáticas (*Yin et al., 2019*). Con estos métodos, varias secuencias de ADN amplificadas se pueden secuenciar a la vez y no es necesaria la clonación bacteriana ya que se hace con la formación de librerías en un sistema libre de células donde las muestras se codifican con secuencias nucleotídicas distintas (*Yang et al., 2014*). Es menester mencionar que la cantidad de muestras que pueden ser introducidas en una librería depende de: la cantidad de códigos de barras diferentes disponibles, la capacidad de secuenciación de la plataforma de NGS que utilicemos, el número y los tamaños de las regiones diana y la profundidad con la que se desea realizar la secuenciación (*Børsting y Morling, 2015*). Posteriormente, se realiza el templado, la unión de las secuencias de ADN a una superficie sólida mediante primers que hibridan con una secuencia añadida anteriormente, y se produce una PCR en emulsión o una PCR puente para que haya una separación física entre las moléculas de ADN. Finalmente, se utilizan desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) marcados con fluoróforos que nos permitirán determinar la secuencia mediante secuenciación cíclica reversible. Esto consiste en la adición de flujos de los diferentes nucleótidos en los chips en los que se encuentran las secuencias y la detección de la emisión de iones de hidrógeno que se observa cuando un nucleótido marcado se une a la cadena dándonos la secuencia de nucleótidos específica de ese ADN, además de producir un cambio en el pH de la reacción (*Alonso et al., 2018*).

1.4. Aplicaciones de los análisis genéticos para identificación humana:

Las metodologías anteriores permiten la identificación de restos óseos que se encuentran en un estado altamente degradado debido al paso del tiempo, como es el caso de restos humanos procedentes de conflictos bélicos. En este contexto, la Guerra Civil Española y la posterior etapa de represión franquista produjeron una gran cantidad de víctimas cuyos restos permanecen sin identificar.

A modo de reseña histórica, tras el fin de la dictadura de Miguel Primo de Rivera (1923-1930), se instaura por segunda vez en la historia de España una República, siendo conocida como II República Española (1931-1936), donde se conseguirán avances sociales como el sufragio universal, a partir del cual las mujeres podrán votar

en las elecciones. Pero también fue un periodo de inestabilidad política con trágicos sucesos como el levantamiento de Casas Viejas en Cádiz (1933) o la Revolución de Asturias (1934), que será sofocada por el joven general Francisco Franco. Esta inestabilidad política se agravó tras el resultado de las terceras elecciones en cinco y últimas (1936), las cuales fueron polémicas debido a un posible “pucherazo”. En estas, ganó el frente popular y las inseguridades sociales se intensificaron en las calles llegándose a producir tiroteos con una gran cantidad de muertos y donde varios generales del ejército empezaron a plantearse un levantamiento frente a la República. Todo esto desembocó en el asesinato del líder de la derecha, José Calvo Sotelo (1893-1936), lo cual animó a algunos generales que aún no se habían decidido, como Francisco Franco, a participar un levantamiento contra la República.

Así, un 17 de julio de 1936 comenzó la Guerra Civil Española, con el levantamiento de las tropas africanas en Melilla, siendo además un golpe de Estado con éxito parcial en el resto de la península. Este suceso bélico, el cual se convertirá en el más sangriento de la historia de España y del que sigue habiendo heridas todavía abiertas en la actualidad, se dividió en varios periodos en los cuales una cantidad masiva de personas de ambos bandos murieron en el frente, así como muchos fueron asesinados en las retaguardias y enterrados en fosas comunes a lo largo de todo el territorio español. Este enfrentamiento fratricida fue el preludio a la Segunda Guerra Mundial, siendo una guerra moderna con conflictos brutales y prolongados donde las grandes potencias de la época aprovecharon para poner a prueba las nuevas tecnologías militares, dando ejemplo de ello el bombardeo de Guernica (1937), ejecutado por la Legión Cóndor (fuerza aérea del III Reich), y que posteriormente fue inmortalizado para la historia por el famoso pintor malagueño Pablo Picasso. Otro de los acontecimientos importantes fue la Batalla del Jarama en la cual el bando nacional intentó tomar Madrid sin éxito. Posteriormente, en julio de 1938 tiene lugar la Batalla del Ebro, la cual fue decisiva en el fin de la guerra dado que, tras esta, el bando republicano se vio seriamente afectado y el bando nacional fue tomando las diversas zonas de España. Terminando esta guerra con el inicio de la Dictadura de Franco en 1939.

Las cicatrices producidas por la Guerra Civil Española y la posterior Dictadura franquista, fueron el fundamento para la creación de la Constitución Española de 1978, cuyo objetivo principal era la reconciliación de la sociedad española acabando

así con la historia de vencedores y vencidos, procurando obtener y asegurar la democracia en el país. Para ello era necesario la formación de políticas públicas tales como la Ley 52/2007, de 26 de diciembre, también denominada “Ley de Memoria Histórica”, la cual fue creada por la Comisión Interministerial que estudiaba la situación de las víctimas de la Guerra Civil y del franquismo, creada por Real Decreto 1891/2004. En esta, se reconocen y amplían los derechos y se establecen medidas en favor de quienes padecieron persecución o violencia durante la Guerra Civil Española y la dictadura franquista. Sin embargo, con la restauración de los departamentos ministeriales en 2020, pasó a denominarse Memoria Democrática. En la actualidad, la ley vigente es la Ley 20/2022, de 19 de octubre, de Memoria Democrática.

En base a esta ley debemos considerar que este suceso histórico debe ser estudiado de forma imparcial con el objetivo de aumentar nuestro conocimiento científico y la identificación de las personas que fueron perseguidas, ejecutadas y enterradas en fosas comunes en aquellos años.

1.5. Laboratorio de Identificación Genética de Granada:

El Laboratorio de Identificación Genética del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la UGR es responsable del Programa de Identificación de Víctimas de la Guerra Civil en Andalucía. Así, al amparo del proyecto de Memoria Histórica y Democrática (Ley 52/2007 de 26 de diciembre; Orden 190/2007 de 7 de diciembre), el laboratorio de Identificación Genética estableció un convenio con la Junta de Andalucía que le autoriza a extraer ADN de los restos óseos de las fosas comunes, pudiéndolos cotejar con el aportado por sus respectivos familiares.

El perfil genético de los familiares se obtiene mediante el análisis de muestras biológicas, principalmente ADN presente en la mucosa bucal, aunque también se puede obtener a partir de sangre o, incluso, pelo. En el caso de España, según la ley 10/2007, de 22 de junio, los perfiles genéticos que se analizan en las fuerzas de seguridad tanto nacionales como regionales y los organismos dependientes del instituto nacional de toxicología y ciencias forenses se encuentran englobados en el

sistema CODIS (Combined DNA Index System), originalmente establecido por el FBI (Oficina Federal de Investigación).

Desde el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada, también se llevan a cabo otra serie de proyectos concretos:

- DNA-Prokids: proyecto universal que se basa en luchar contra el tráfico de personas, principalmente de menores entre países. Para ello se busca identificar personas que hayan sido sustraídas de sus familias ya sea por adopciones ilegales u otros sucesos con la consiguiente devolución a sus familias, así como la obtención de la información sobre los orígenes, rutas y medios que hayan sido utilizados para esta circulación entre países.
- Programa Fénix: convenio de colaboración entre la Universidad de Granada y la Dirección General de la Guardia Civil para la creación de una base de datos de personas desaparecidas.
- Identificación Genética de los restos de Cristóbal Colón: Análisis de los restos de Colón para la determinación de su origen.
- Ejercicios de intercomparación: se trata de la organización, ejecución y evaluación de una serie de procedimientos de una misma muestra en distintos laboratorios de acuerdo con unas condiciones concretas. Esto se realiza con el fin del control de la calidad tanto del ensayo como de la muestra enviada, así como el rendimiento de los laboratorios. Éstos están formados por la International Society for Forensic Genetics (ISFG).

No obstante, en este trabajo nos vamos a centrar en el proyecto de Memoria Histórica y Democrática, en el cual se trabaja con muestras de restos humanos. En relación a los restos óseos analizados de aquella época, existen problemas más allá de los que existen en los análisis de ADN de muestras recientes debido: al tiempo transcurrido desde la muerte, la degradación (producida por la paralización de los procesos enzimáticos que se producen en el interior celular y que le confieren integridad y estabilidad al material genético, lo cual se intensifica aún más debido a la proliferación de bacterias y hongos en el medio en el que se encuentra el cuerpo), el terreno (dentro del cual entran factores como: el pH, la temperatura, la salinidad, el viento, el agua, entre otros, pudiendo dar lugar a una destrucción física del material genético y/o problemas en su secuencia (*Rizzi et al., 2012*)), la dificultad de encontrar

familiares que sean directos tales como padres o hermanos preferiblemente y la presencia de los cuerpos en fosas comunes lo cual lleva a la mezcla de estos e incluso a la posibilidad de que personas que estén enterradas allí no tengan que ver con el acontecimiento (Crespillo Márquez et al., 2023; Pääbo et al., 2004; Willerslev y Cooper, 2005).

Las muestras que se analizan en el proyecto son de décadas atrás, por lo que el material genético remanente en ellas se conoce como ADN antiguo (aDNA). Su baja concentración en comparación con el ADN moderno puede derivar en una grave afección por contaminantes externos (Kirsanow y Burger, 2012). Esta puede agravarse debido al aumento de tamaño de los poros que presentan los huesos, con el paso de tiempo. Dicha contaminación, así como los largos ciclos de PCR a los cuales se somete el aDNA para su análisis pueden dar lugar a falsos positivos (Willerslev y Cooper, 2005).

Por otro lado, la PCR resultó ser útil a la hora de la identificación de la degradación del aDNA. La cual se puede detectar en función de: (I) la correlación inversa entre la eficiencia de amplificación y la longitud de la amplificación, uno de los indicadores más simples y efectivos de la degradación en muestras antiguas y (II) la cantidad de uracilo presente en las muestras debido a la acción de la desaminación de las citosinas que se da en los extremos del ADN ya que en dicha zona se encuentra principalmente ADN de cadena simple (Korlević et al., 2015). Este es un proceso en el cual las citosinas se convierten en uracilos que son leídos como timinas por la ADN polimerasa dando lugar a cambio de enlaces $G \equiv C$ a enlaces $T = A$ (Pääbo et al., 2004; Willerslev y Cooper, 2005), ocurriendo con mayor frecuencia conforme avanza el tiempo (Peyrégne y Prüfer, 2020). Además, nos permite la detección de contaminaciones con ADN moderno, sin embargo, nos puede llevar a desechar perfiles genéticos correctos que no presenten grandes concentraciones de citosinas desaminadas.

En la actualidad, la introducción de la NGS permite la recuperación del aDNA (Rizzi et al., 2012). Es por ello que se utiliza como principal herramienta a la hora de la identificación genética de los restos óseos en el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada.

1.5.1 Características del laboratorio de extracción de restos óseos:

Debido a las propiedades del ADN antiguo, es necesario tener un laboratorio con ciertas medidas. Es por ello que el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada presenta un laboratorio específico para la extracción de ADN de los restos de las víctimas de la Guerra Civil Española y la postguerra. En dicho laboratorio existe un almacén-vestidor en el cual los investigadores se vestirán adecuadamente con equipos de protección individual (EPIS). A continuación, hay un laboratorio dividido en dos partes, en la primera sección del laboratorio encontramos la zona en la cual se llevará a cabo la toma de fotos, el registro en el ordenador de las muestras y los procedimientos que se les realizan, la limpieza y corte de los restos óseos en una campana de extracción de gases, la pulverización en el “TissueLyser” y el pesado del polvo de hueso. En la segunda área, encontramos el laboratorio en el cual se va a llevar a cabo la extracción y amplificación del ADN, en el cual encontramos una cabina de flujo laminar, centrifugas, un horno, termobloques, entre otros.

Ambas zonas se encuentran separadas físicamente ya que el polvo de los huesos que estén siendo limpiados, cortados o pulverizados, aunque estos procedimientos se lleven a cabo en la campana de extracción de gases, puede pasar a la zona de extracción de ADN dando lugar a contaminaciones cruzadas de las muestras que se están analizando. Es menester destacar la presencia de tubos de luz ultravioleta (UV) tanto en la campana de extracción de gases y la cabina de flujo laminar como en el laboratorio ya que son una manera de evitar contaminaciones.

1.5.2 Identificación genética a partir de restos óseos:

En este laboratorio de muestras mínimas se lleva a cabo la identificación genética a partir de restos óseos de las víctimas de la Guerra Civil Española y de la postguerra. Esta investigación se realiza en este tipo de tejido ya que después de largos periodos de tiempo, el ADN se conserva únicamente en el esqueleto.

Los huesos se dividen en cinco tipos: planos, largos, cortos, irregulares y sesamoideos, dentro de los cuales se encuentran huesos tales como tibia, peroné, pelvis, entre otros. Sin embargo, a la hora de la identificación genética de restos óseos los que destacan tradicionalmente son: fémur y dientes.

Con respecto al fémur, se trata del hueso más largo del cuerpo y se encuentra en la zona del muslo. Por otro lado, los dientes se consideran huesos, sin embargo, son estructuras calcificadas que se encuentran en las mandíbulas, en la cavidad oral, de algunos mamíferos y cuya función está relacionada con la alimentación. Estos anatómicamente se dividen en (Figura 1.6): corona (zona expuesta en la boca) y raíz (zona que se encuentra en el interior de la encía). La corona se encuentra formada por el esmalte, tejido más duro del cuerpo humano, acelular que cubre la corona y permite la permanencia del ADN intacto en el diente. En cambio, la raíz está formada por: dentina (compuesto por hidroxiapatito en forma carbonada) y pulpa (interior del diente muy vascularizado y con tejido conectivo innervado que contiene numerosos tipos celulares) (Higgins y Austin, 2013; Izawa et al., 2017), a partir de la cual se obtiene el ADN para la creación de perfiles genéticos. Sin embargo, se ha demostrado que el ADN presente en el hueso alveolar (aquel que forma parte de la estructura que da soporte a los dientes) permanece intacto con el paso del tiempo dando lugar a perfiles de STRs completos, por lo que sería de gran utilidad a la hora de la identificación genética (Gawali et al., 2021).

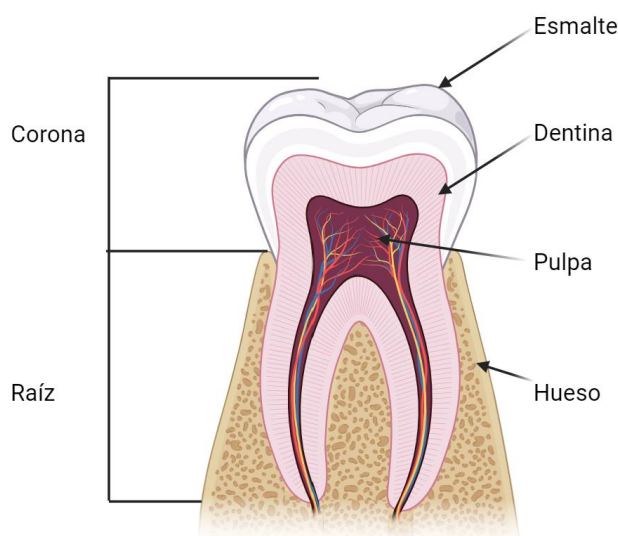


Figura 1.6: Anatomía de los dientes (elaboración propia, creado con Biorender).

No obstante, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones sobre otros huesos que podrían ser de valor para la identificación genética. En estas se ha demostrado que el hueso petroso, es de gran utilidad en estos procedimientos (Gonzalez et al., 2020; Haarkötter et al., 2023; Hansen et al., 2017; Ibrahim et al., 2022; Pilli et al., 2018). Este se encuentra entre los huesos occipital y esfenoide,

formando parte del hueso temporal, componiendo así la cavidad donde se encuentran los órganos de la audición y del equilibrio. Cabe destacar que se trata del hueso más denso del cuerpo de los mamíferos, además, es un hueso no remodelado, protegido por la cápsula óptica y con menor vascularización que los dientes, lo cual impide la degradación por microorganismos del ADN presente en él, dando lugar así a una mayor cantidad de ADN para la generación de perfiles genéticos.

La creación de perfiles genéticos de víctimas de hace décadas es un trabajo complejo y duro, debido a la descomposición de los restos y a la alta degradación que el aDNA presenta en los huesos. Es por ello que la selección de las muestras que se vayan a utilizar a la hora del análisis para la identificación genética humana es un factor a considerar (*Haarkötter et al., 2023*). No obstante, se ha demostrado en algunos experimentos que la presencia de colágeno y fibras de proteínas de la fase inorgánica que absorben ADN permiten una mayor preservación del material genético en los restos (*Gonzalez et al., 2020*).

Además, en cuanto a la extracción de ADN a partir de los dientes, cabe destacar que cuando un diente se extrae directamente de la mandíbula para su posterior análisis, en ellos hay menor contaminación que en los fragmentos de otros huesos o en otros dientes procedentes de la misma muestra que se encuentran extraídos de la mandíbula (*Rizzi et al., 2012*). Esto último, además, puede dar lugar a la creación de perfiles genéticos que no sean de la persona ya que no podemos demostrar que los dientes sean procedentes de dicha persona.

Para ello, se lleva a cabo un procedimiento muy similar para las distintas muestras mencionadas anteriormente. Este consiste en: (I) limpieza y corte de los restos con ayuda de una Dremel (Wisconsin, EEUU), posterior radiación con luz UV, por ambas caras de los fragmentos cortados, para la eliminación de los contaminantes exógenos (*Harrel y Hughes-Stamm, 2020*); (II) pulverización de los restos óseos con “TissueLyser” (aunque existen otros métodos para la obtención de ADN a partir de huesos sin la necesidad de pulverizarlos (*Harrel y Hughes-Stamm, 2020*); (III) extracción de ADN, el cual es un proceso arduo debido a: (1) los métodos diseñados son principalmente para células y tejidos que se encuentran en condiciones favorables, (2) este se encuentra dañado por lo que no se pueden utilizar detergentes fuertes o altas temperaturas que darían lugar a una degradación mayor y (3) la

presencia de inhibidores en los restos óseos producen una interferencia en la amplificación de dicho ADN (*Rohland y Hofreiter, 2007*). Es por ello que es necesario la necesidad de procedimientos especiales para este tipo de material genético. Pudiendo realizarse la extracción mediante extracción automatizada o de forma orgánica con fenol/cloroformo, siendo más viable el método este último (*Kuś et al., 2016*); (IV) cuantificación del ADN mediante PCR en tiempo real (qPCR); (V) amplificación de los fragmentos a estudiar por PCR (cuya calidad se ve mediante RFU (*Gonzalez et al., 2020*); (VI) análisis de los STRs autosómicos mediante NGS o incluso electroforesis capilar (*Pilli et al., 2018*).

Una vez se han realizado los métodos pertinentes para generar el perfil genético de la víctima, así como de sus familiares, es necesario realizar un análisis estadístico de los resultados comparando ambos perfiles genéticos con la ayuda de programas bioinformáticos. Dentro de estos, merece una especial mención la integración del módulo DVI (Disaster Victim Identification) en el programa Familias ya que nos permite calcular las probabilidades en los casos donde sabemos el perfil genético de alguien, pero las relaciones con sus familiares se encuentran en duda (*Crespillo Márquez et al., 2023*). Además, existen otros programas, como el software M-FISys (Mass Fatality Identification System) de Gene Codes Forensic, que nos ayudan con la comparación de perfiles genéticos entre familiares y víctimas para llegar a una identificación acertada de los restos óseos.

Sin embargo, cabe destacar que a veces el resultado estadístico es ambiguo debido a la alta degradación del ADN o a la presencia de parientes en una línea lejana debido a que los padres, hijos y hermanos han ido muriendo a lo largo de los años. Cuando esto ocurre lo que se suele hacer es ampliar los marcadores que estamos analizando (*Pontes et al., 2017*).

1.6. Gestión de la calidad: ISO 17025:

En cuestión de gestión de la calidad en los laboratorios, existe la Organización Internacional de Normalización (ISO), federación mundial de organismos nacionales de normalización que realizan una serie de estándares con el fin de crear niveles de igualdad con respecto a la gestión y servicios que las empresas desempeñen, entre ellas, los laboratorios. Es así como se constituyeron las normas ISO, un conjunto de

reglas que nos permiten asegurarnos de la calidad de las investigaciones que se llevan a cabo en ellos. Se crearon con el fin de determinar si los laboratorios trabajan de forma correcta y eficiente. Dentro de estas hay diversas ramas dentro de las cuales se encuentra la ISO 17025, la cual garantiza que se realiza un protocolo correcto en la ejecución de los métodos utilizados por los laboratorios. Esta se encuentra dentro de los requisitos de las recomendaciones de la Red Europea de Institutos de Ciencia Forense (ENFSI), así como viene representada en las guías de validación del “Scientific Working Group on DNA Analysis Methods” (SWGDM).

Además, dichas reglas nos permiten la detección del origen de una contaminación o de algún fallo en el caso de que este existiera en alguno de los procedimientos llevados a cabo.

1.7. Gestión de la contaminación en el laboratorio de genética forense:

La contaminación se define como la transferencia a posteriori de ADN en un crimen (*Gill, 2002*). Este suceso puede ocurrir durante las fases preanalítica y analítica (*Basset y Castella, 2019; Pickrahn et al., 2017*). En la primera fase se puede dar en: la toma de las muestras, el proceso de transporte de estas o en el almacenamiento de las mismas. Mientras que en la segunda fase puede suceder en cualquiera de los procedimientos necesarios para la identificación, tales como son: la preparación de las muestras, la extracción del ADN, la cuantificación o la amplificación del ácido nucleico en cuestión. Es en esta segunda fase en la cual se puede producir la contaminación cruzada, es decir, puede haber traspaso de ADN entre muestras que estén siendo analizadas en el laboratorio. Sobre este tema se tienen escasos conocimientos, sin embargo, sabemos que existe mayor probabilidad de este tipo de contaminación entre muestras que se encuentran en la misma columna o fila con respecto a aquellas que se encuentran más alejadas durante los experimentos (*Lou et al., 2023*).

Además, el paso de ADN a una muestra se puede dar mediante dos vías:

- Directa: la cual se produce no sólo por contacto, sino por estornudar, toser o incluso hablar cerca de la muestra.
- Indirecta: a través de un objeto que ha sido contaminado anteriormente (*Buckingham et al., 2016*).

Este proceso se puede deber a ADN de microorganismos presentes en el ambiente, por ADN microbiano de los investigadores, así como el presente en la extracción o en la formación de librerías. Todos estos tipos de transferencia de ADN a las muestras se conocen como contaminaciones externas (*Lou et al., 2023*).

La transmisión de ADN a las muestras de un laboratorio puede producir patrones inusuales de diploidía como pueden ser marcadores en heterocigosis en secuencias de los cromosomas X o Y en macho, así como la aparición de mezcla de perfiles con la presencia de secuencias del cromosoma Y en mujeres. Debe tenerse en cuenta que la contaminación femenina en un individuo masculino incrementa el ratio entre el cromosoma X y los autosomas, mientras que la contaminación de una muestra de un hombre a una muestra de una mujer produce la disminución de dicho ratio (*Peyrégne y Prüfer, 2020*).

1.7.1 Prevención:

Sin embargo, todos estos problemas se pueden prevenir de diversas formas. En un laboratorio de genética forense donde no se trabaja con muestras mínimas (en grave estado de degradación y/o con bajo contenido de ADN) sino con muestras que presentan, por lo general, altas concentraciones de ADN, la principal forma de prevención es el uso de guantes, mascarilla, campana extractora y llevar el pelo recogido. Esto previene frente a la transmisión de ADN por parte del investigador a las muestras que están siendo analizadas. Esto serían medidas para minimizar la contaminación por vía directa.

No obstante, también existen otros métodos como son la presencia de dos laboratorios para la realización de las distintas fases de la PCR: (1) un laboratorio en el cual se lleve a cabo la parte de preparación de muestras, extracción de ADN y almacenamiento, habiendo una presión positiva en él, el cual denominaremos laboratorio pre-PCR; y (2) otro en el que se lleve a cabo la amplificación y análisis de PCR y que debe presentar una presión negativa, denominado laboratorio post-PCR. Entre estos dos podemos observar una clara diferencia relativa al: nivel de ADN que hay en ambos, siendo menor en el primero (*Remillard et al., 2013*). Es menester que no exista flujo de materiales de la zona post-PCR a la zona pre-PCR, para así reducir la posibilidad de contaminaciones por vía indirecta. La transmisión por esta vía puede ser disminuida, además, mediante el alicuotado de reactivos (los cuales, cuando sea

viable, deben cumplir con las normas ISO 18385, en la cual se contemplan los requerimientos para reducir los riesgos por contaminación de productos utilizados en muestras biológicas), el autoclavado de los materiales y/o reactivos (siempre que sea factible) y la automatización de los procesos. En el caso de mecanizar las técnicas, la introducción de sistemas automatizados de extracción del ADN permite la disminución de la intervención de técnicos en los procedimientos, reduciendo así el número de posibilidades de contaminación (*Basset y Castella, 2019*). Todo esto viene recogido en la guía de prevención y detección de contaminación elaborada por el SWGDAM, dentro del cual además se recogen las prevenciones en los laboratorios que analizan muestras biológicas deterioradas.

Sin embargo, en laboratorios diseñados especialmente para la realización del procesamiento y análisis de muestras mínimas, éstas deben ser tratadas más cautelosamente debido a una mayor posibilidad de contaminación cruzada (*Yin et al., 2019*). Dicha contaminación resultaría en consecuencias catastróficas a la hora del reconocimiento de los restos humanos, por lo que en estos casos se requieren unas medidas más específicas para prevenir la contaminación. El control y gestión de la contaminación en este tipo de laboratorios, que es el que se emplea para la extracción de muestras a partir de restos óseos procedentes de fosas, es un procedimiento fundamental.

Los requisitos principales son: la presencia de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air), los cuales proporcionan una presión en el interior del laboratorio ligeramente superior a la del exterior para evitar la introducción de ADN y los microbios de objetos del exterior (*Weyrich et al., 2019*); lámparas con luz ultravioleta C para favorecer la degradación de los restos que puedan quedar de ADN contaminante; reactivos libres de ADN; equipos de protección individual (EPIS) por parte de los investigadores. Esta vestimenta, la cual se encuentra en almacén-vestidor fuera del laboratorio donde los investigadores deberán colocársela, consiste en: guantes, mascarilla, gorro, mono integral, cubrezapatos y, en caso de ser necesario, cubremangas. A su vez, para evitar las cadenas de contaminación el acceso al laboratorio debe estar restringido y una única persona debe realizar los procesos de una muestra en concreto.

La limpieza y descontaminación de las áreas de trabajo, así como de los instrumentos utilizados para la extracción del ADN son de vital importancia a la hora de la prevención o la reducción del paso de ADN a las muestras o entre ellas (*Basset y Castella, 2019*). Esto es debido a que la contaminación presenta una relación directa con el número de experimentos que realicemos en un área, es decir, cuanto mayor sea el número de experimentos, mayor será la probabilidad de contaminación en dicha zona (*Kampmann et al., 2017*).

Esta limpieza se puede llevar a cabo mediante diversos procedimientos y con distintos agentes químicos o enzimáticos, siendo algunos de ellos: lejía, etanol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteinasas o ácidos (*Remillard et al., 2013*). También es útil usar DNAzap (Invitrogen™ AM9890, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) para degradar cualquier tipo de ácido nucleico que haya presente en la superficie que haya sido rociada con este reactivo (*Vandewoestyne, 2011*). Además, en los restos óseos es pertinente realizar una limpieza para eliminar el mayor porcentaje posible de ADN microbiano existente en la parte externa de los mismos. Para ello, se puede utilizar lejía ya que elimina hasta un 64% del ADN microbiano y no causa más daño que el que puede causar en sí el mismo protocolo de extracción en el ADN del hueso (*Korlević et al., 2015*).

Por otro lado, la descontaminación de las superficies se puede realizar con luz UV, es por ello que es un requisito muy importante la presencia de lámparas con este tipo de luz en los laboratorios de muestras mínimas, así como en las cabinas de flujo laminar del laboratorio donde se manipulan las muestras. Sin embargo, cabe destacar, que la utilización de luz UV para la reducción de la contaminación depende de la distancia a la cual se encuentren los objetos o las superficies a descontaminar de esta, así como una menor longitud de onda permite una eliminación más eficiente del ADN exógeno en las superficies que una mayor longitud de onda. No obstante, este método por sí solo no elimina todo el ADN exógeno de las superficies (*Preuße-Prange et al., 2009*), es por ello que sería necesario la utilización de agente químicos o enzimáticos como los mencionados anteriormente para la correcta desinfección de las superficies.

En el laboratorio de muestras mínimas del Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada, para asegurar que no haya contaminación en estas muestras, todos los días después de la utilización de los instrumentos

necesarios para la preparación de las muestras y purificación de ADN, se debe realizar una limpieza de éstos.

La limpieza es distinta dependiendo de la naturaleza de los mismos. En el caso de los materiales tales como urnas, viales, cucharas dosificadoras, campanas y balanza, se utilizan: detergentes, lejía 10%, agua destilada, etanol y DNAzap. La cabina de flujo laminar y la campana de extracción se limpia con lejía 10%, agua destilada, etanol, DNAzap y posteriormente durante 30 minutos aproximadamente se irradian con luz UV, al igual que se hace con los viales y las cucharas.

Por otro lado, tras una semana de trabajo o cuando se requiera, se debe limpiar el laboratorio de muestras mínimas completo a fondo, según el siguiente protocolo: todas las superficies y los equipos son limpiados con lejía 10% y secados con papel “secamanos”. Posteriormente, se limpian con agua destilada y secamos antes de aplicar etanol y secar de nuevo. Por último, se deben aplicar las dos soluciones de DNAzap en las superficies de trabajo, así como en ciertos equipos tales como las centrifugas, dejándola actuar durante tres minutos y secando las superficies y los equipos una vez pasado este tiempo. Además de la limpieza del suelo con agua, detergente y lejía. Así como debemos poner la luz ultravioleta en todo el laboratorio entre 30 y 50 minutos. Es menester destacar que lo comentado anteriormente es parte imprescindible para obtener y mantener una acreditación del laboratorio bajo la norma ISO 17025, la cual es la que permite la realización de los análisis de identificación genética certificados.

1.7.2 Detección de contaminación:

La capacidad de los métodos de análisis de ADN forense para generar perfiles de ADN de muestras con baja concentración de ADN nos permite detectar cuando existe contaminación (*Pickrahn et al., 2017*).

El descubrimiento de contaminación en las superficies del laboratorio se hace mediante un análisis que puede ser con hisopos sobre superficies. Sin embargo, existe controversia en la eficacia de este método a la hora de la detección de ADN ya que ha producido una gran variedad de resultados dependiendo del tipo de superficie, solvente utilizado o el tipo de analítica (*Remillard et al., 2013*). El test del hisopado contiene cuatro etapas que consisten en: colección de ADN de superficies con hisopos humedecidos con agua, extracción del ADN de los hisopos con tampones tales como

proteinas K y tampón de lisis (ATL), purificación del ADN y análisis mediante qPCR, de los niveles de ADN humano contenido. Este es un test ideal para esta tarea debido al bajo coste y a la simplicidad del mismo. Según algunos autores el área a hisopar es clave, esta debe ser mayor de 100 cm², pero menos de 4000 cm² ya que un área mayor impide la eficiencia del test probablemente debido a que el hisopo se seque durante el proceso (*Remillard et al., 2013*).

El uso de controles negativos durante la preparación y/o la secuenciación es importante, siendo algunos de estos controles: reactivos sin muestras de ADN biológicas (para comprobar que no se encuentran contaminado y/o corroborar que la amplificación se dé de forma correcta) (*Weyrich et al., 2019*) o tubos vacíos para comprobar que estos no se encuentran contaminados. Sin embargo, este tipo de controles nos ofrecen una visión limitada de la contaminación y no nos permite saber cuántas muestras se ven afectadas (*Lou et al., 2023*).

La determinación de la persona que ha producido la contaminación, se puede convertir en una tarea sencilla si tenemos bases de datos de las personas que tienen acceso a las muestras y a los laboratorios, lo cual está recomendado por la ENFSI (*Pickrahn et al., 2017*). En estas bases de datos, se encuentran los perfiles genéticos de las personas que trabajan en el laboratorio.

En caso de que detectemos contaminación se deberá aplicar un protocolo más estricto en dicho laboratorio a fin de eliminarla.

2. OBJETIVOS:

Teniendo en cuenta todos estos aspectos expuestos anteriormente, los objetivos de este trabajo son:

- 1- Comparación de los métodos de limpieza de los laboratorios de muestras mínimas de la Universidad de Granada.
- 2- Verificación y seguimiento del control de la contaminación en el laboratorio de muestras mínimas de la Universidad de Granada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. Recogida de muestras para control de contaminación:

En dicho procedimiento, se utilizan hisopos rotulados con los correspondientes códigos de las zonas (Tabla 3.1), empapados en agua ultrapura específica del laboratorio de muestras mínimas. Estos hisopos son pasados por las superficies de la zona de trabajo como son: vial de pulverización cogido al azar, urna de metacrilato cogida al azar, campana de extracción de gases, cabina de flujo laminar, poyata una cada semana. Así como utilizamos un hisopo sólo empapado con agua como control, para asegurarnos de que el agua no está contaminada. Dejándolos secar en la cabina de flujo laminar.

Tabla 3.1: Códigos de las áreas del laboratorio de muestras mínimas.

Área	Código
A1	Poyata en la que se encuentra el "TissueLyser".
A2	Campana de extracción de gases.
A3	Poyata de la balanza.
A4	Poyata en la que se encuentra el horno.
A5	Poyata de las centrifugas.
A6	Cabina de flujo laminar.
S1	Viales de pulverización.
S2	Automate Express.
S3	Urnas de metacrilato.
Cx	Agua ultrapura.

3.2. Preparación de las muestras:

Comenzamos rotulando tantos tubos Eppendorf de 1'5 mililitros (mL) (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) como muestras tengamos, en los cuales se hará la lisis, con los correspondientes códigos de las zonas (Tabla 3.1), así como un control negativo en el cual sólo echaremos los reactivos para asegurarnos que estos no están contaminados. Continuamos cortando la punta de los hisopos con un bisturí, introduciéndola en el tubo Eppendorf correspondiente (Figura 3.1). Este bisturí ha sido anteriormente limpiado con lejía 10%, agua destilada y etanol, durante 10 segundos, secándolo entre los químicos mencionados con papel secamanos. Cabe destacar que el resto del hisopo se guarda en el frigorífico (4°C) por si fuera necesario realizar el procedimiento de nuevo, en caso de salir un resultado no concluyente.

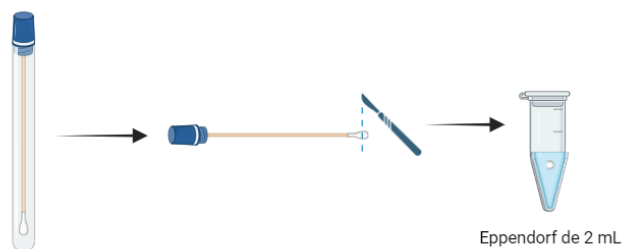


Figura 3.1: Procedimiento de preparación de muestras (elaboración propia, creado con Biorender).

Todo este proceso se hará en la cabina de flujo laminar del laboratorio de muestras mínimas para impedir una posible contaminación de las muestras tanto entre sí como con posible ADN que pueda existir en la zona de trabajo (lo cual tiene una baja probabilidad debido a las medidas preventivas que se realizan en dicha área). Además, tras la preparación de varias muestras es necesario cambiar los tubos de lejía 10%, agua destilada y etanol ya que se crean residuos tanto de las muestras como del bisturí que se va oxidando.

3.3. Registro de hisopado de superficies:

Para asegurarnos de que todas las superficies están libres de contaminación y de que nuestro método de desinfección funciona, se debe llevar a cabo un registro de: la fecha de análisis, las superficies o áreas que se hisopan (poniendo en la ficha de registro los códigos correspondientes a las zonas que vienen presentes en la Tabla 3.1), realizar un control visual (en el cual se analiza si observamos suciedad, restos de polvo de huesos, etcétera), un control del hisopado (que en este experimento, el control se realizó del agua utilizada para humedecer el hisopo, así como de los reactivos utilizados para la lisis y de los Eppendorfs utilizados para la extracción del ADN) y los resultados de estos hisopados que se visualizan a través de un electroferograma (ver más adelante) y deben ir adjuntos a las fichas de registro (Tabla 3.2). Además, estos deberían ser revisados por una persona externa a la que ha realizado los experimentos. Por lo que nos quedaría una ficha de la siguiente manera:

Tabla 3.2: Ficha de registro de hisopado de superficies de laboratorio de muestras mínimas.

Fecha	Superficie/área	Control visual	Control hisopado	Cumple	Revisado por:
16/02/24	A2	Limpio	OK	SI	X

16/02/24	A5	Limpio	OK	SI	X
16/02/24	A6	Limpio	OK	SI	X
16/02/24	S1	Limpio	OK	SI	X
16/02/24	S3	Limpio	OK	SI	X
16/02/24	Cx	Limpio	OK	SI	X
19/03/24	A2	Limpio	OK	SI	X
19/03/24	A3	Limpio	OK	SI	X
19/03/24	A6	Limpio	OK	SI	X
19/03/24	S1	Limpio	OK	SI	X
19/03/24	S3	Limpio	OK	SI	X
19/03/24	Cx	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	A1	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	A2.1	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	A6	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	S1	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	S3	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	Cx.1	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	A2.2	Limpio	OK	SI	X
16/04/24	Cx.2	Limpio	OK	SI	X
20/05/24	A2	Limpio	OK	SI	X
20/05/24	A3	Limpio	OK	SI	X
20/05/24	A6	Limpio	OK	SI	X
20/05/24	S1	Limpio	OK	SI	X
20/05/24	S3	Limpio	OK	SI	X
20/05/24	Cx	Limpio	OK	SI	X

Este procedimiento se realizó una vez cada mes, los días: 16 de febrero, 19 de marzo, 16 de abril y 20 de mayo.

Es menester hablar sobre LIMS (Laboratory Information Management Systems), el cual se trata de una herramienta muy útil en el campo de la genética forense debido a que nos permite realizar una trazabilidad de las muestras, formar grupos de varias muestras que vayan a ser analizadas a la vez (ya sea a la hora de la

extracción, cuantificación, amplificación y/o secuenciación), importación de datos desde instrumentos tales como IonChef (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) o ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, California, Estados Unidos) y transferencia de los mismos a analizadores genéticos, monitorización de los procesos que se lleven a cabo en las máquinas comentados anteriormente, entre otros (*Barrio et al., 2017*).

En nuestro caso, vamos a registrar las muestras que hemos tomado en el laboratorio de muestras mínimas en un mismo grupo/batch en el LIMS. En este, estarán las muestras que hemos puesto en la tabla de arriba, así como un control negativo de extracción del ADN, con una codificación interna. Una vez registradas las muestras debemos añadir los procedimientos que le vamos a realizar (extracción de ADN, amplificación mediante “GlobalFiler/GlobalFiler IQC” (Applied Biosystems, Life Technologies, California, Estados Unidos), secuenciación) y poner que los procedimientos están completados conforme se vayan realizando.

Todo esto se hace para llevar un control de las muestras de control, las fechas de la realización de los procedimientos, el registro de cualquier posible contaminación, la agrupación de los resultados de los diversos controles de contaminación, seguimientos de los lotes de reactivos utilizados por si hubiera contaminación en estos, entre otros.

3.4. Extracción del ADN:

Una vez tenemos las puntas de los hisopos en los tubos Eppendorf correspondientes, debemos realizar la lisis de las células para la extracción del ADN de su interior (Figura 3.2). Para este proceso debemos poner 400 µL de ATL (QIAGEN, Hidden, Alemania) y 20 µL de proteinasa K en cada uno de los Eppendorfs. A continuación, los ponemos en el termobloque (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 56°C y 900 rpm durante una hora. Este procedimiento se lleva a cabo en el laboratorio de muestras mínimas.

Pasado este tiempo, introducimos las muestras en un guante del laboratorio de muestras mínimas y las bajamos al laboratorio pre-PCR. En él, debemos purificar el ADN de la muestra que tenemos. Este proceso se lleva a cabo de modo automatizado en el equipo QIAcube (QIAGEN, Hilden, Alemania). Aunque antes de introducirlo en

el equipo es necesario eliminar la punta del hisopo del interior del tubo Eppendorf con la ayuda de una punta estéril de pipeta, no sin antes presionarla contra la pared para permitir la elución de la muestra al completo, y tirarla al lugar correspondiente. En este procedimiento lo que se realiza es el paso de nuestra muestra a través de una columna de sílice. Comienza con la colocación de la columna de sílice encima de un tubo Eppendorf de 1'5 mL, continuando con el paso de nuestra muestra por la columna con la adición de AL cambiando así su pH para que el ADN se quede adherido en la columna y el resto de componentes eluyan a través de ella. A continuación, se añaden otros 3 buffers en el siguiente orden: AW1, etanol, AW2 y etanol, para eliminar las impurezas (membranas celulares, aparato de Golgi, vesículas, retículo endoplasmático, etcétera) de nuestra muestra. A posteriori, eluye el ADN purificado a un tubo Eppendorf nuevo de 1'5 mL mediante la adición de un tampón de elución (ATE) que cambia el pH permitiendo la escisión del ADN de la membrana. Este se almacenará en el frigorífico a (4°C) hasta el día siguiente cuando se realizará una PCR para determinar si existe ADN o no en las muestras. Todos los reactivos mencionados anteriormente se encuentran en el kit "QIAamp DNA Investigator QIAcube" (QIAGEN, Hilden, Alemania).

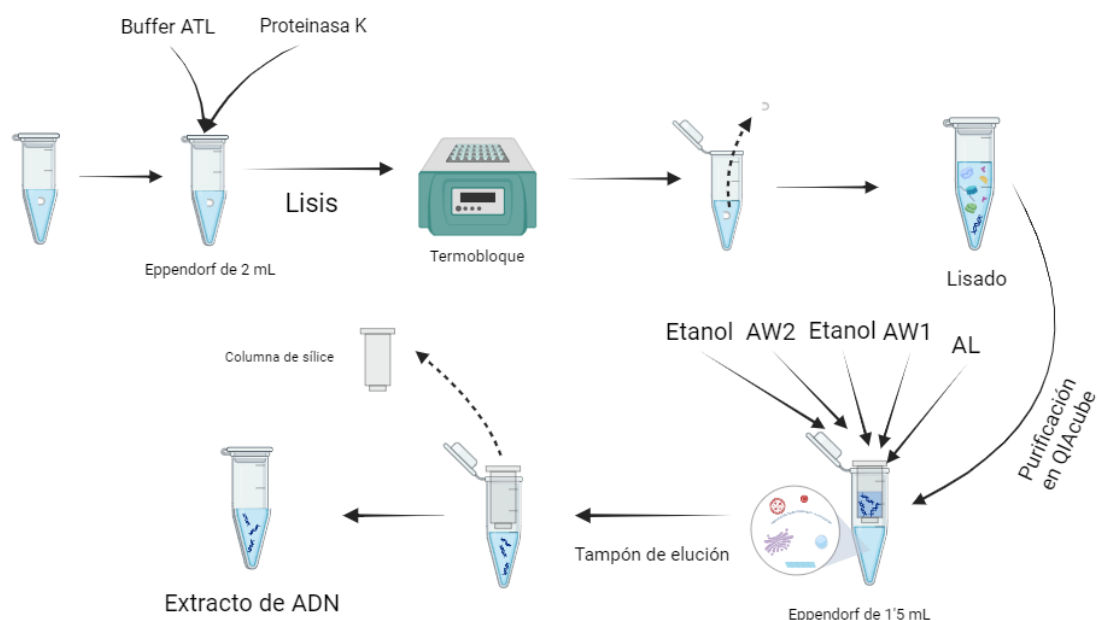


Figura 3.2: Procedimiento de extracción de ADN (elaboración propia, creado con Biorender).

3.5. Amplificación por PCR:

La amplificación se realizará con el kit “GlobalFiler/GlobalFiler IQC”, en el cual encontramos: reactivos, primers y un tubo con el control positivo (K+). Este kit contiene 6 fluoróforos (6-FAM™, VIC™, NED™, TAZ™, SID™, LIZ™) que nos IQC permiten amplificar 24 marcadores: 21 marcadores de STRs autosómicos, el STR del cromosoma Y, un marcador de polimorfismos de inserción/delección del cromosoma Y, así como el gen de la amelogenina (Figura 3.3).

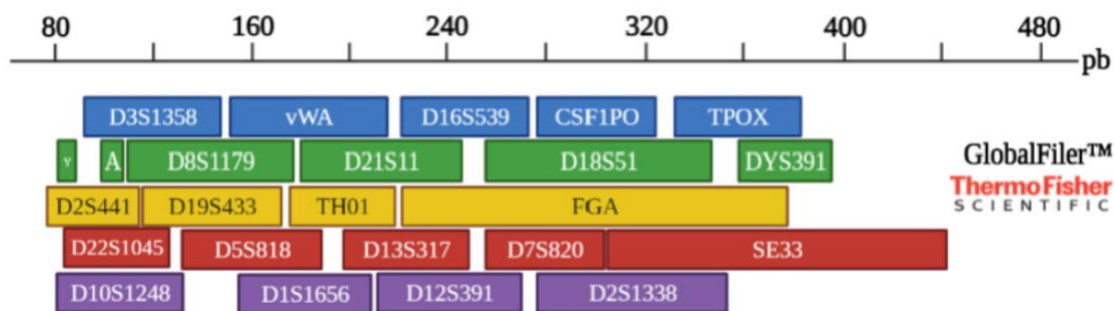


Figura 3.3: Esquema de los amplicones de “GlobalFiler/GlobalFiler IQC” por tamaño de pares de bases (Haarkötter Cardoso, 2024). Editado con Biorender. Siendo el color azul 6-FAM™, el color verde VIC™, el color negro NED™, el color rojo TAZ™, el color morado SID™ y el color naranja LIZ™.

En este procedimiento comenzamos con la rotulación de los tubos de PCR. Posteriormente realizaremos la MasterMix (MM) en un tubo Eppendorf, esta consta de 7'5 µL de reactivos (dentro de los cuales se encuentra la polimerasa, magnesio, tampones que mantienen el pH necesario para que se realice la reacción, entre otros) y 2'5 µL de primers por muestra, teniendo en cuenta los controles negativo y positivo. En nuestro caso, tenemos 9 muestras, sin embargo, la mezcla la haremos para una muestra de más debido al error de pipeteo. Por lo tanto, la MM estará compuesta por 75 µL de reactivos y 25 µL de primers. De esta mezcla, debemos echar 10 µL en todos los pocillos menos en el Ladder (pocillo que servirá de control de la PCR).

En los pocillos en los cuales van a ir nuestras muestras debemos echar 15 µL de nuestra muestra aparte de la MM.

Teniendo todo esto en cuenta, finalmente en cada pocillo (menos en el del Ladder) tendremos 25 µL.

Una vez hemos realizado las mezclas, tapamos los tubos de PCR con sus respectivos tapones. Y, por último, llevamos la placa al termociclador, en el cual pondremos el siguiente ciclo:

1. 95°C durante 1 minuto para que se produzca una primera desnaturalización del ADN para la apertura de las hebras, permitiendo la unión de la polimerasa.
2. 94°C durante 10 segundos.
3. 59°C durante 1 minuto y medio. Tiempo en el cual se produce la unión de la polimerasa con las hebras del ADN y la extensión de los fragmentos que se amplifican.
4. Los pasos 2 y 3 se repiten 29 veces.
5. 60°C durante 10 minutos para que aquellos fragmentos que no tengan una extensión completa la realicen.
6. 4°C infinito. Aunque es mucho mejor meterlo en el frigorífico a 4°C para que se conserve mejor el ADN.

Debido a la alta sensibilidad de la PCR, bajas concentraciones de ADN pueden dar lugar a falsos positivos. Por ello a continuación realizamos la secuenciación de las muestras. Además de, en caso de contaminación, poder comparar el perfil genético que salga en la muestra con el de los investigadores que trabajan en el laboratorio de muestras mínimas.

3.6. Análisis de los STRs autosómicos mediante Electroforesis Capilar:

El análisis de los resultados de la PCR se hace mediante electroforesis capilar con el equipo secuenciador ABI 3500. En este procedimiento, utilizaremos una mezcla de formamida y LIZ. La formamida permite mantener desnaturalizado el ADN, favoreciendo que la velocidad de avance de las hebras sencillas sea proporcional a su tamaño. La incisión de los láseres en los fluoróforos unidos a las bases nitrogenadas. Por otro lado, el LIZ es un marcador de peso molecular permite extrapolar el tamaño exacto de los amplicones que hemos obtenido en nuestra PCR multiplex y que viene marcado con otro fluoróforo diferente.

Para esta mezcla utilizaremos 0'5 µL de LIZ y 9'5 µL de formamida por muestra, obteniendo finalmente 110 µL ya que echamos para una muestra de más por si hubiera error de pipeteo. De esta mezcla, introduciremos 10 µL en los pocillos de la

placa para la secuenciación y, a continuación, cogeremos nuestras muestras amplificadas del frigorífico y pondremos 1 µL de muestra en su pocillo correspondiente (Tabla 3.3). En el caso del Ladder (marcador de ADN que permite el genotipado de la mayor parte de los alelos para los loci que se encuentran en el kit) se pone el correspondiente al de la química utilizada en la PCR anterior, siendo en este caso “GlobalFiler/GlobalFiler IQC”. Como se ha descrito anteriormente, la realización de controles es esencial. Por lo que, debemos realizar un control negativo de extracción de ADN (QC-) para detectar cualquier posible contaminación en los reactivos de este procedimiento. Así como, un control negativo de amplificación (K-) que consta de 15 µL de agua para controlar que el agua que utilizamos para la amplificación no se encuentra contaminada por ADN externo y un control positivo de amplificación (K+) que se basa en 10 µL de agua y 5 µL de K+.

Tabla 3.3: Placa de secuenciación.

A	Ladder	Cx										
B	K-	QC-										
C	K+											
D	A2											
E	Poyata											
F	A6											
G	S1											
H	S3											

Una vez realizada la placa colocamos el septa encima de los pocillos. A continuación, centrifugamos la placa durante unos segundos para que las gotas superficiales bajen al fondo del pocillo. Después de este procedimiento, ponemos la placa con el septa en el termociclador para desnaturalizar las hebras del ADN, con el siguiente ciclo:

- 95°C durante 3 minutos y medio.
- 4°C durante 3 minutos.
- 12°C hasta que lo saquemos del termociclador.

Por otro lado, antes de realizar la secuenciación en el ABI 3500 debemos hacer una placa en el LIMS para controlar las muestras que vamos a secuenciar. Esta placa

debemos meterla en el programa del ABI 3500 y seleccionar el método que vamos a utilizar en las muestras que en este caso es el “GlobalFiler/GlobalFiler IQC”, así como la carpeta a la cual se van a exportar los datos, para ello seleccionaremos test en el programa.

Una vez hecho esto, debemos introducir la placa con el septa en un retenedor para analizadores genéticos y ponerlo en el lugar A o B, pero especificándolo en el programa, cerrar el ABI 3500 e iniciar la electroforesis capilar.

Para la obtención de resultados debemos esperar alrededor de uno 45 minutos por muestra y se verán posteriormente en el software GeneMapper ID-X v1.6 de Applied Biosystems.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Los resultados de la secuenciación por electroforesis capilar de las muestras para el control de contaminación del laboratorio de muestras mínimas se visualizan en un electroferograma. En el caso del kit “GlobalFiler/GlobalFiler IQC”, éste presenta moléculas de ADN sintético, así como primers específicos para amplificarlos denominados IQC (controles de calidad internos) y que vienen incluidas en el Master Mix. Estos deben amplificar en la PCR siempre y nos aseguran la ausencia de inhibidores que pudieran dificultar la reacción. A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en las cuatro rondas de revisión de contaminación, en concreto se presentan imágenes del electroferograma obtenido para cada una de las muestras con el mencionado software.

A pesar de que el kit que estamos utilizando presente gran variedad de marcadores, debido a la limitación de páginas y para evitar perder visibilidad en las imágenes, únicamente aparecen los resultados de 5 marcadores STRs.

4.1. Resultados análisis 16/02/2024:

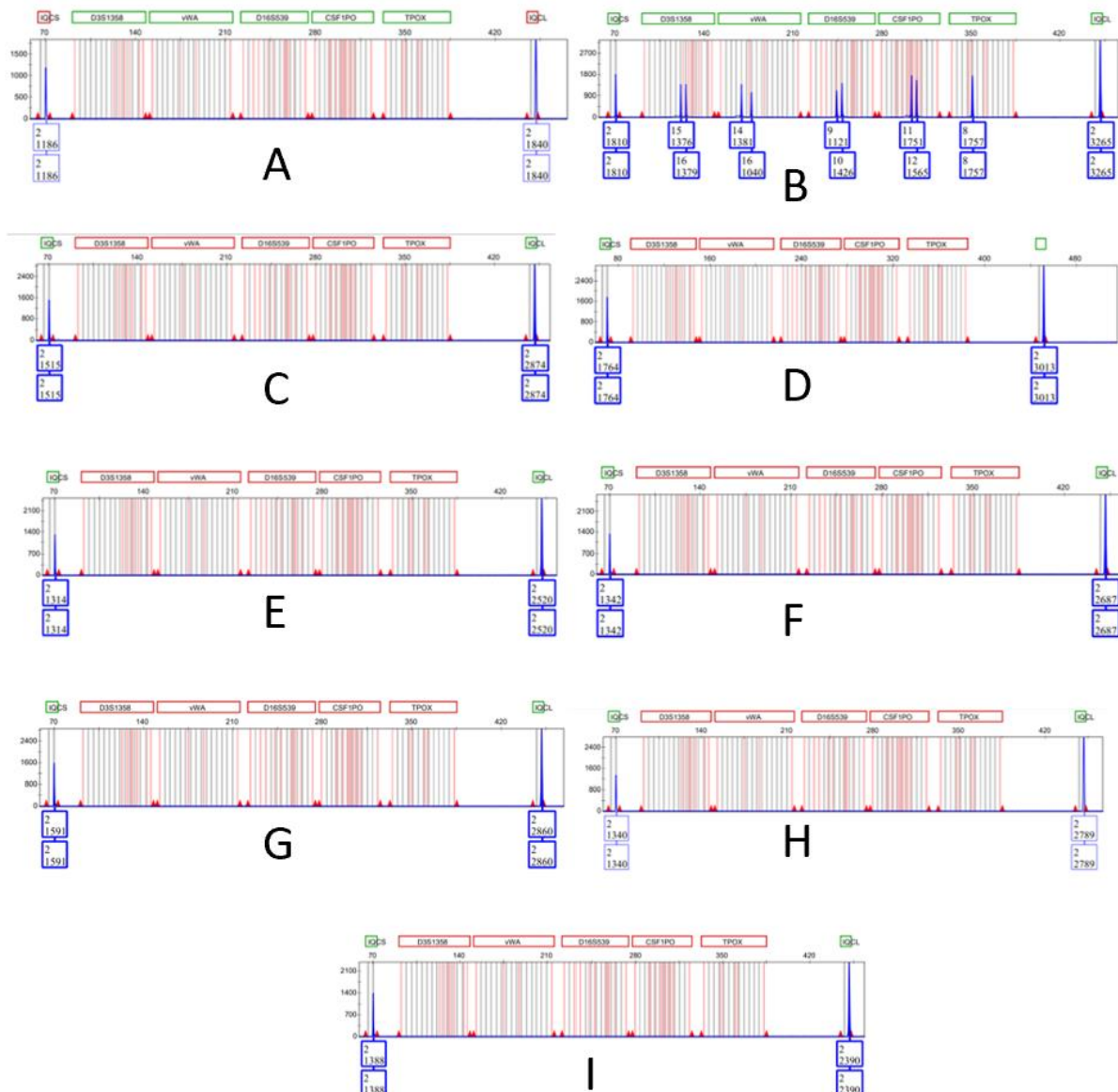


Figura 4.1: Resultados del 16/02/2024. Electroferograma donde se muestran los resultados correspondientes al control de contaminación para las diversas muestras realizados para el mes de febrero. La nomenclatura de cada muestra está explicada en el texto. El eje X representa RFU, mientras que el eje Y representa el tamaño del ADN en pb. En azul se encuentran señalados los controles de calidad internos. Los números en azul representan las RFU.

En los resultados del análisis del día 16/02/2024 (Figura 4.1) podemos observar lo siguiente: en la imagen A (control negativo (K-) de amplificación) no existe contaminación, dado que no se obtuvo amplificación para ninguno de los marcadores STR, y ambos controles IQC funcionaron correctamente; en la imagen B (control positivo (K+) de amplificación) encontramos ciertos picos en los diversos marcadores

STR, lo cual es correcto ya que en estos pocillos añadimos ADN exógeno. Esto nos indica que la amplificación se ha llevado a cabo correctamente y que en caso de que haya presencia de ADN se hubiera detectado; en la imagen C (campana de extracción de gases (A2)), no existe contaminación, esto lo podemos ver ya que no hay existencia de picos en el electroferograma para los STRs autosómicos; en la imagen D (poyata de las centrífugas (A5)), no existe contaminación; en la imagen E (cabina de flujo laminar (A6)), no existe contaminación; en la imagen F (viales (S1)), no existe contaminación; en la imagen G (urnas (S3)), no existe contaminación; en la imagen H (agua utilizada para humedecer los hisopos (Cx)), no hay contaminación; y en la imagen I (control negativo de extracción (QC-)) no hay contaminación, por lo que los reactivos no presentan ADN exógeno.

4.2. Resultados análisis 19/03/2024:

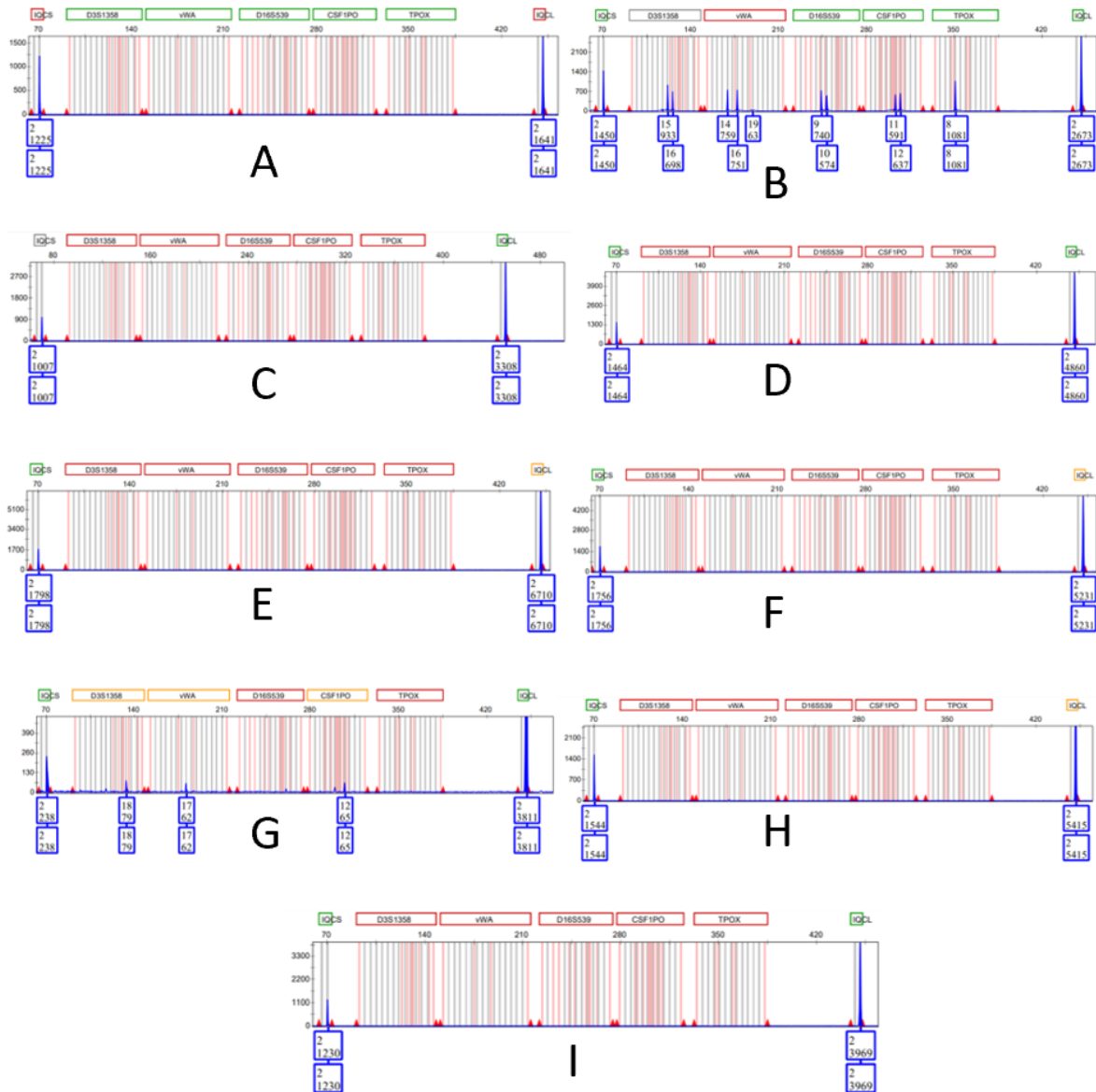


Figura 4.2: Resultados del 19/03/2024. Electroferograma donde se muestran los resultados correspondientes al control de contaminación para las diversas muestras realizados para el mes de marzo. La nomenclatura de cada muestra está explicada en el texto. El eje X representa las RFU, mientras que el eje Y representa la intensidad de fluorescencia. En azul se encuentran señalados los controles de calidad internos. Los números en azul representan las RFU.

En el caso de los resultados del análisis del día 19/03/2024 (Figura 4.2) podemos observar lo siguiente: en la imagen A (control negativo (K-) de PCR) no existe contaminación, por lo que los reactivos de la PCR no contienen ADN exógeno; en la imagen B (control positivo (K+) de PCR) sale correcto; en la imagen C (campana de extracción de gases (A2)), no existe contaminación; en la imagen D (poyata de la

balanza (A3)), no existe contaminación; en la imagen E (cabina de flujo laminar (A6)), no existe contaminación; en la imagen F (viales (S1)), no existe contaminación; en la imagen G (urnas (S3)), existe una contaminación. Este perfil se comparó con el de los investigadores que trabajan en el laboratorio de muestras mínimas y salió que era de una persona que trabaja allí espontáneamente, pero no con las urnas. Por lo que la contaminación puede ser debida al toque del hisopo mientras se estaba secando, la presencia de su ADN en algún área de trabajo donde se haya realizado el paso del ADN de los tubos a las placas de PCR. No se repitió el hisopado ya que se hizo en una urna al azar; en la imagen H (agua utilizada para humedecer los hisopos (Cx)), no hay contaminación; y en la imagen I (control negativo de extracción (QC-)) no hay contaminación en los reactivos utilizados.

4.3. Resultados análisis 16/04/2024:

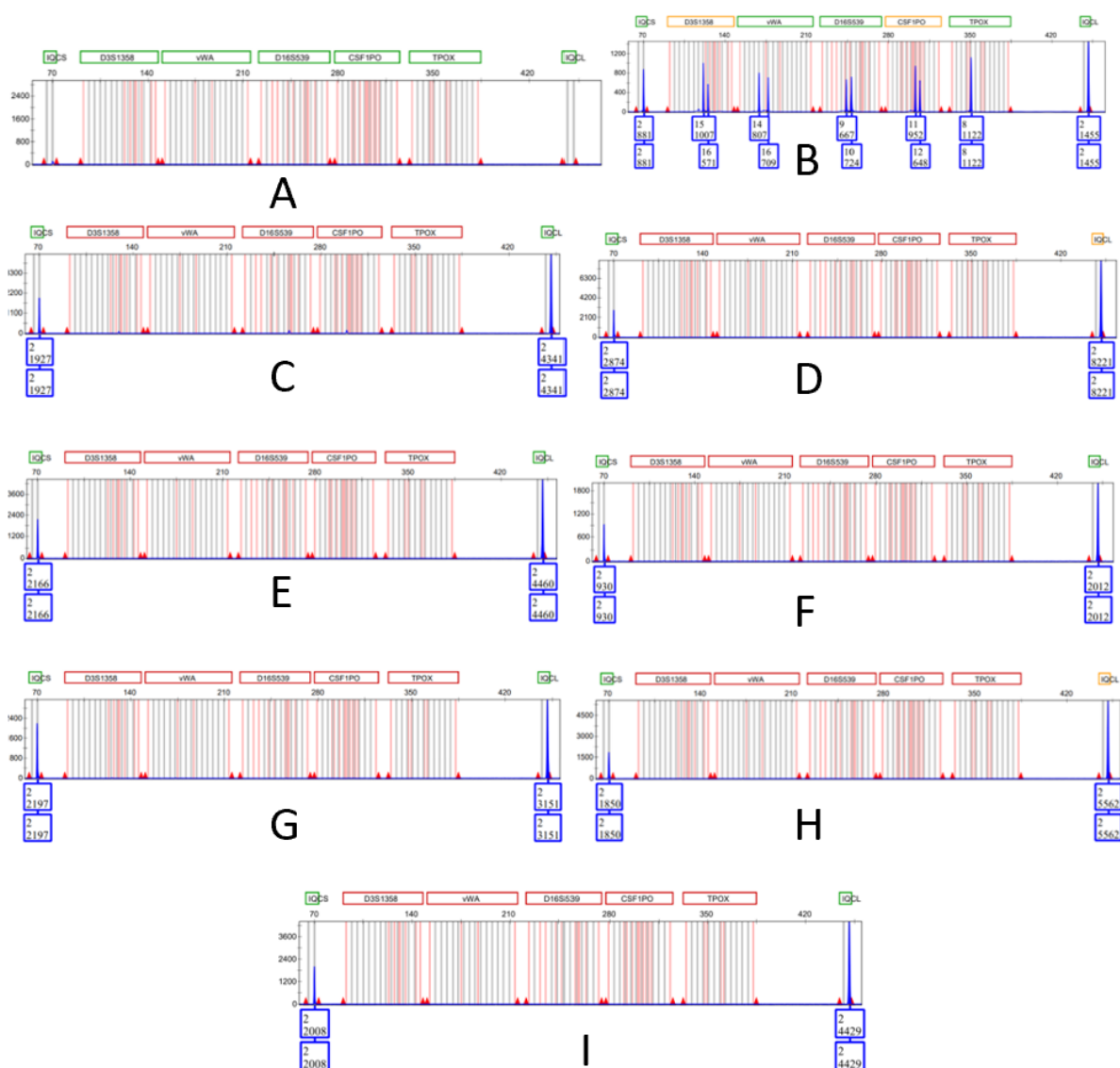


Figura 4.3: Resultados del 16/04/2024. Electroferograma donde se muestran los resultados correspondientes al primer control de contaminación para las diversas muestras realizados para el mes de abril. La nomenclatura de cada muestra está explicada en el texto. El eje X representa las RFU, mientras que el eje Y representa la intensidad de fluorescencia. En azul se encuentran señalados los controles de calidad internos. Los números en azul representan las RFU.

En el caso de los resultados del análisis del día 16/04/2024 (Figura 4.3) podemos observar lo siguiente: en la imagen A (control negativo (K-) de amplificación) no existe contaminación; en la imagen B (control positivo (K+) de amplificación) se ve un perfil correcto; en la imagen C (campana de extracción de gases (A2.1)), existe una pequeña contaminación como podemos observar, hay unos pequeños picos en los marcadores D3S1358, D16S539 y CSF1PO; en la imagen D (poyata del “TissueLyser”

(A1)), no existe contaminación; en la imagen E (cabina de flujo laminar (A6)), no existe contaminación; en la imagen F (viales (S1)), no existe contaminación; en la imagen G (urnas (S3)), no existe contaminación; en la imagen H (agua utilizada para humedecer los hisopos (Cx.1)), no hay contaminación; y en la imagen I (control negativo de extracción (QC-)) no existe contaminación.

Debido a la contaminación en la muestra A2, se volvió a realizar un hisopado de la zona, una vez realizados los procedimientos correspondientes de limpieza:

En los resultados del análisis del segundo hisopado de A2 del día 16/04/2024 (Figura 4.4) podemos observar lo siguiente: en la imagen A (control negativo (K-) de amplificación) no existe contaminación; en la imagen B (control positivo (K+) de amplificación) sale correcto; en la imagen C (campana de extracción de gases (A2.2)), podemos comprobar que la contaminación ha desaparecido, por lo que el problema era una baja limpieza del área; en la imagen D (control negativo de extracción (QC-)) no existe contaminación.

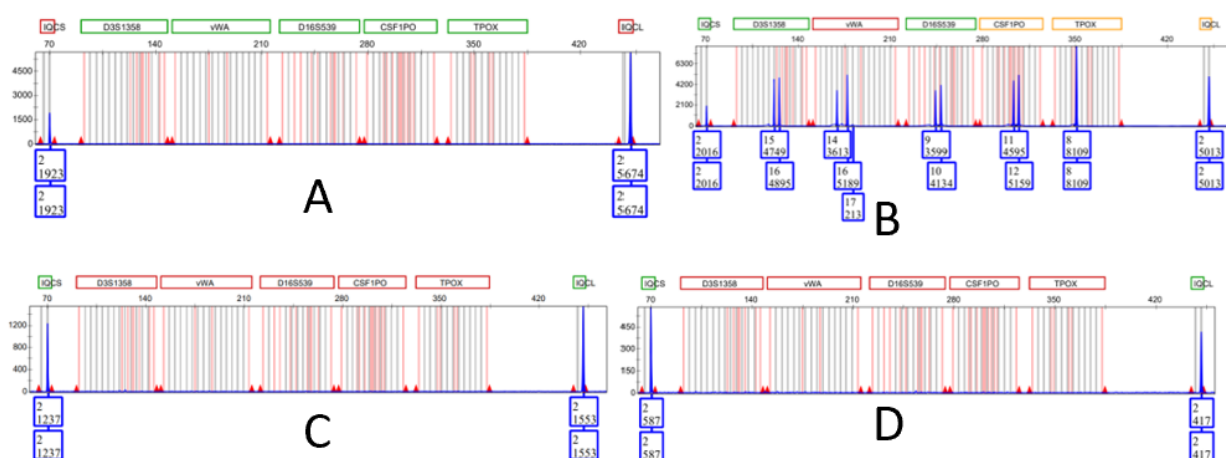


Figura 4.4: Resultados del 16/04/2024 segundo hisopado. Electroferograma donde se muestran los resultados correspondientes al segundo control de contaminación para las diversas muestras realizados para el mes de abril. La nomenclatura de cada muestra está explicada en el texto. El eje X representa las RFU, mientras que el eje Y representa la intensidad de fluorescencia. En azul se encuentran señalados los controles de calidad internos. Los números en azul representan las RFU.

4.4. Resultados análisis 20/05/2024:

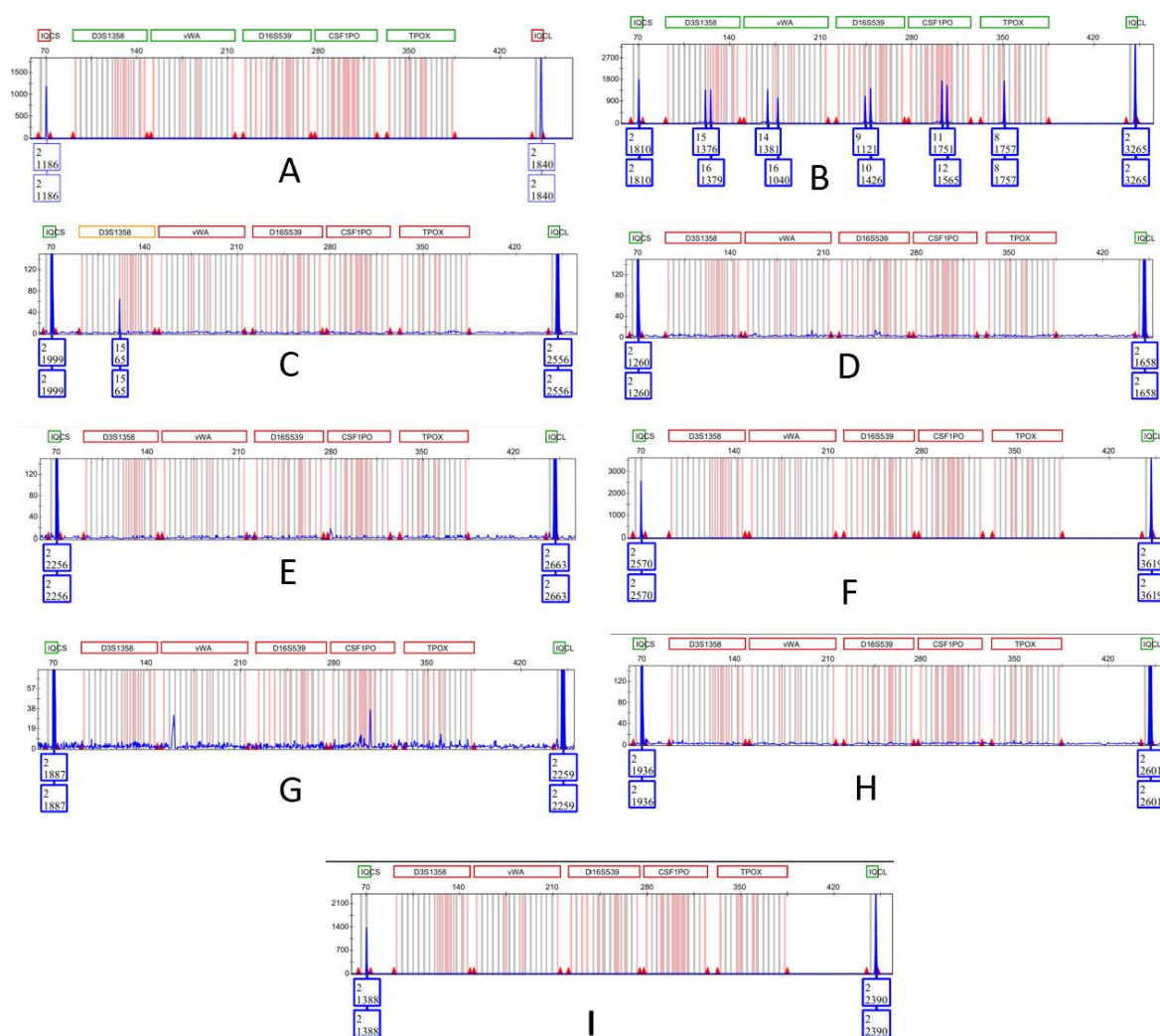


Figura 4.5: Resultados del 20/05/2024. Electroferograma donde se muestran los resultados correspondientes al control de contaminación para las diversas muestras realizados para el mes de mayo. La nomenclatura de cada muestra está explicada en el texto. El eje X representa las RFU, mientras que el eje Y representa la intensidad de fluorescencia. En azul se encuentran señalados los controles de calidad internos. Los números en azul representan las RFU.

En los resultados del día 20/05/2024 (Figura 4.5) observamos: en la imagen A (control negativo (K-) de amplificación) no existe contaminación; en la imagen B (control positivo (K+) de amplificación) obtenemos un perfil correcto; en la imagen C (campana de extracción de gases (A2)), existe una pequeña contaminación como podemos observar, hay un pequeño pico en el marcador D3S1358; en la imagen D (poyata de la balanza (A3)), no existe contaminación; en la imagen E (cabina de flujo laminar (A6)), existen unos pequeños picos, sin embargo, al no superar el rango en

el que consideramos que existe ADN en la muestra (50 RFU) no consideramos que haya una contaminación; en la imagen F (agua utilizada para humedecer los hisopos (Cx.1)), no hay contaminación; en la imagen G (viales (S1)), no existe contaminación; en la imagen H (urnas (S3)), no existe contaminación; y en la imagen I (control negativo de extracción (QC-)) no existe contaminación.

Debido a los picos observados sería necesario llevar a cabo otro ensayo de control después de la limpieza pertinente en las diversas áreas e instrumentos.

Parte de los resultados obtenidos eran de esperar ya que la lejía al 10% es uno de los agentes que eliminan mejor el ADN en las superficies (*Kampmann et al., 2024*). Sin embargo, la utilización de etanol después de limpiar la superficie con agua destilada es limitada (*Kampmann et al., 2017*), pero no nula como podemos ver en nuestros resultados. Por otro lado, la utilización de DNAzap consigue una mayor descontaminación de las superficies y no produce corrosión en aquellos materiales que sean más sensibles como es el caso de las urnas en las cuales se lleva a cabo la limpieza, corte y obtención del pulverizado de hueso en genética forense (*Vandewoestyne, 2011*).

No obstante, cabe destacar que la ISO 18385 recomienda la utilización de óxido de etileno en gas para la descontaminación de los materiales. Ciertos artículos (*Archer et al., 2010; Neureuther et al., 2014; Wilson-Wilde et al., 2017*) verifican la efectividad de la utilización de este agente para la prevención de la contaminación. Además, también se habla de otras sustancias tales como el plasma de hidrógeno como posible agente frente a la contaminación de los laboratorios. En el caso del plasma de hidrógeno se ha demostrado que permite la prevención de la contaminación, a pesar de tratarse de un tratamiento inferior al que se produce con el gas de óxido. Sin embargo, el procedimiento requiere menor tiempo, no hiere la salud de los humanos y puede ser utilizado en materiales y reactivos plásticos para el uso forense. Aunque no debe ser utilizado en líquidos o materiales que contengan celulosa (*Hashiyada et al., 2022*).

5. CONCLUSIONES:

En conclusión, llevando a cabo los procesos de desinfección y limpieza que se realizan en el laboratorio de muestras mínimas del Laboratorio de Identificación

Genética de la Universidad de Granada se disminuyen significativamente los riesgos de contaminación. Así, como se puede observar en los resultados pertenecientes a un intervalo de trabajo de 4 meses, casi no se ha detectado contaminación en los diversos controles llevados a cabo. Destacando la importancia de la limpieza a fondo sobretodo de aquellas zonas en las que se lleve a cabo la limpieza y el corte de hueso.

Por otro lado, el reporte de las contaminaciones que ocurran en el laboratorio es de vital importancia a la hora del avance en los análisis de las muestras procedentes de las fosas. Ya que una contaminación ya se produzca en: la campana de extracción de gases donde se lleva a cabo la limpieza y corte de los huesos, la cabina de flujo laminar donde se lleva a cabo parte de la extracción y amplificación del ADN de los restos óseos que se estén analizando o en los reactivos podrían derivar en una contaminación de un gran número de muestras dando lugar a falsos positivos o incluso hasta dar perfiles genéticos que no correspondan con la identidad de las muestras que estamos analizando. Es por ello que los laboratorios deben realizar informes de las contaminaciones que se den en sus áreas de trabajo y descontaminen la zona lo antes posible para la continuación de los proyectos.

Además, es menester la obtención de una acreditación por parte del laboratorio donde se exprese los investigadores que se encuentran dentro del equipo de trabajo del proyecto con el fin de asegurar la autenticidad de los perfiles genéticos de las muestras analizadas.

Con vistas a futuro, a pesar del conocimiento que se tiene acerca de agentes que funcionan para la prevención de la contaminación, es necesario realizar más investigaciones con el fin de conseguir nuevos métodos que permitan la eliminación de la mayor cantidad posible de ADN exógeno que pueda haber en los laboratorios donde se lleve a cabo el análisis de muestras que presenten décadas, centenares o hasta, incluso, miles de años. Pudiendo así reducir el número de casos de contaminación en dichos laboratorios y ampliando la fiabilidad de los perfiles genéticos, de las víctimas cuyos restos óseos se encuentran en fosas, obtenidos en laboratorios especializados en su análisis.

6. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCIAS:

Adachi, N., Umetsu, K., y Shoji, H. (2014). Forensic strategy to ensure the quality of sequencing data of mitochondrial DNA in highly degraded samples. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 16(1), 52–55.

<https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2013.10.001>

Alonso, A., Barrio, P. A., Müller, P., Köcher, S., Berger, B., Martin, P., Bodner, M., Willuweit, S., Parson, W., Roewer, L., y Budowle, B. (2018). Current state-of-art of STR sequencing in forensic genetics. *Electrophoresis*, 39(21), 2655–2668.

<https://doi.org/10.1002/elps.201800030>

Archer, E., Allen, H., Hopwood, A., y Rowlands, D. (2010). Validation of a dual cycle ethylene oxide treatment technique to remove DNA from consumables used in forensic laboratories. *Forensic Science International. Genetics*, 4(4), 239–243.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.004>

Barrio, P. A., Martin, P., y Alonso, A. (2017). LIMS configuration to fit new massively parallel sequencing workflows in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e104–e106.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.040>

Basset, P., y Castella, V. (2019). Positive impact of DNA contamination minimization procedures taken within the laboratory. *Forensic Science International. Genetics*, 38, 232–235. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.013>

Børsting, C., y Morling, N. (2015). Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Science International. Genetics*, 18, 78–89.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.002>

Buckingham, A. K., Harvey, M. L., y van Oorschot, R. A. H. (2016). The origin of unknown source DNA from touched objects. *Forensic Science International. Genetics*, 25, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.015>

Ciencia del genoma. (n.d.). Retrieved June 6, 2024, from

https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v63_n4/ciencia_genoma.htm

- Crespillo Márquez, M., Barrio Caballero, P. A., y Farfán Espuny, M. J. (2023). Contributions and advances of forensic genetics in mass fatality incidents. *Spanish Journal of Legal Medicine*, 49(2), 55–63.
<https://doi.org/10.1016/j.remle.2023.08.003>
- Diegoli, T. M. (2015). Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes. *Forensic Science International. Genetics*, 18, 140–151.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.013>
- SWGDM Contamination Prevention and Detection Guidelines for Forensic DNA Laboratories. Disponible en:
https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_c4d4dbba84f1400a98eaa2e48f2bf291.pdf
- ENFSI. <https://enfsi.eu/>
- Falagán, A. A., Cadet, G. V., Guerra, O. R., y Eglis Yanet Ramírez Delgado. (2012). Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. *MediSan*.
- FBI, Combined DNA Index System (CODIS):
<https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>
- Francès, F., Castelló, A., y Verdú, F. (2008). El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: Métodos y posibles fuentes de error. *Cuadernos de Medicina Forense*, 52. <https://doi.org/10.4321/S1135-76062008000200002>
- Gawali, R., Kaur, A., Shukla, M., Ganatra, H., Ekka, M. M., y Patel, B. C. (2021). Comparative evaluation of different human dental tissues and alveolar bone for DNA quantity and quality for forensic investigation. *Forensic Science International*, 325, 110877. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110877>
- Gene Codes Forensics: About M-FISys. (n.d.). Retrieved June 7, 2024, from <https://www.genecodesforensics.com/software/>
- GeneMapper™ ID-X Software v1.6, full installation. (n.d.). Retrieved June 7, 2024, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/en/A39975>

- Gettings, K. B., Aponte, R. A., Vallone, P. M., y Butler, J. M. (2015). STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Science International. Genetics*, 18, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.06.005>
- Gill, P. (2002). Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK-- past, present, and future perspectives. *Biotechniques*, 32(2), 366–368, 370, 372, passim. <https://doi.org/10.2144/02322rv01>
- Gonzalez, A., Cannet, C., Zvánigorsky, V., Geraut, A., Koch, G., Delabarde, T., Ludes, B., Raul, J.-S., y Keyser, C. (2020). The petrous bone: Ideal substrate in legal medicine? *Forensic Science International. Genetics*, 47, 102305. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102305>
- Haarkötter, C., Vinueza-Espinosa, D. C., Gálvez, X., Saiz, M., Medina-Lozano, M. I., Lorente, J. A., y Álvarez, J. C. (2023). A comparison between petrous bone and tooth, femur and tibia DNA analysis from degraded skeletal remains. *Electrophoresis*, 44(19–20), 1559–1568. <https://doi.org/10.1002/elps.202300097>
- Haarkötter Cardoso, C. (2024). *Optimización del análisis de ADN de restos óseos críticos*. Universidad de Granada.
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., y Allentoft, M. E. (2017). Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *Plos One*, 12(1), e0170940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940>
- Harrel, M., y Hughes-Stamm, S. (2020). A Powder-free DNA Extraction Workflow for Skeletal Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 65(2), 601–609. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14197>
- Hashiyada, M., Nakanishi, H., Asogawa, M., Akane, A., Saito, K., Miyachi, H., y Osawa, M. (2022). Removal effect of DNA contamination by hydrogen peroxide plasma compared to ethylene-oxide gas. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 54, 102009. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.102009>

- Higgins, D., y Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Science & Justice : Journal of the Forensic Science Society*, 53(4), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>
- Ibrahim, J., Brumfeld, V., Addadi, Y., Rubin, S., Weiner, S., y Boaretto, E. (2022). The petrous bone contains high concentrations of osteocytes: one possible reason why ancient DNA is better preserved in this bone. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.20.492830>
- Izawa, H., Tsutsumi, H., Maruyama, S., y Komuro, T. (2017). DNA analysis of root canal-filled teeth. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 27, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.05.001>
- Kampmann, M.-L., Børsting, C., y Morling, N. (2017). Decrease DNA contamination in the laboratories. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e577–e578. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.223>
- Kampmann, M.-L., Tfelt-Hansen, J., y Børsting, C. (2024). Cleaning protocols in forensic genetic laboratories. *International Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03232-0>
- Kim, S., y Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 289–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>
- Kirsanow, K., y Burger, J. (2012). Ancient human DNA. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 194(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.11.002>
- Korlević, P., Gerber, T., Gansauge, M.-T., Hajdinjak, M., Nagel, S., Aximu-Petri, A., y Meyer, M. (2015). Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. *Biotechniques*, 59(2), 87–93. <https://doi.org/10.2144/000114320>

- Kuś, M., Ossowski, A., y Zielińska, G. (2016). Comparison of three different DNA extraction methods from a highly degraded biological material. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 40, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.03.002>
- Lareu, M. V., y Salas, A. (2000). Chapter 20B Mitochondrial DNA in forensic genetics. In *Forensic Science* (Vol. 2, pp. 707–720). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1567-7192\(00\)80076-5](https://doi.org/10.1016/S1567-7192(00)80076-5)
- Laverde, L. (2013). Sex determination problems in forensic genetic analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e350–e351. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.178>
- Lou, Y. C., Hoff, J., Olm, M. R., West-Roberts, J., Diamond, S., Firek, B. A., Morowitz, M. J., y Banfield, J. F. (2023). Using strain-resolved analysis to identify contamination in metagenomics data. *Microbiome*, 11(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01477-2>
- Ludeman, M. J., Zhong, C., Mulero, J. J., Lagacé, R. E., Hennessy, L. K., Short, M. L., y Wang, D. Y. (2018). Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *International Journal of Legal Medicine*, 132(6), 1555–1573. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1817-5>
- Neureuther, K., Rohmann, E., Hilken, M., Sonntag, M.-L., Herdt, S., Koennecke, T., Jacobs, R., Adamski, M., Reisbacher, S., Alfs, K., Strain, P., y Bastisch, I. (2014). Reduction of PCR-amplifiable DNA by ethylene oxide treatment of forensic consumables. *Forensic Science International. Genetics*, 12, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.006>
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., y Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38, 645–679. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143214>

- Pertea, M., y Salzberg, S. L. (2010). Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biology*, 11(5), 206. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-206>
- Peyrégne, S., y Prüfer, K. (2020). Present-Day DNA Contamination in Ancient DNA Datasets. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 42(9), e2000081. <https://doi.org/10.1002/bies.202000081>
- Pickrahn, I., Kreindl, G., M ller, E., Dunkelmann, B., Zahrer, W., Cemper-Kiesslich, J., y Neuhuber, F. (2017). Contamination incidents in the pre-analytical phase of forensic DNA analysis in Austria-Statistics of 17 years. *Forensic Science International. Genetics*, 31, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.012>
- Pilli, E., Vai, S., Caruso, M. G., D'Errico, G., Berti, A., y Caramelli, D. (2018). Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archaeological bone samples via forensic approach. *Forensic Science International*, 283, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.12.023>
- Pontes, L., Sousa, J. C. de, y Medeiros, R. (2017). SNPs and STRs in forensic medicine. A strategy for kinship evaluation. *Archiwum Medycyny Sadowej i Kryminologii*, 67(3), 226–240. <https://doi.org/10.5114/amsik.2017.73194>
- Preu e-Prange, A., Renneberg, R., Schwark, T., Poetsch, M., Simeoni, E., y von Wurmb-Schwark, N. (2009). The problem of DNA contamination in forensic case work—How to get rid of unwanted DNA? *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 185–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2009.08.164>
- Purps, J., Siegert, S., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Salazar, R., Angustia, S. M. T., Santos, L. H., Anslinger, K., Bayer, B., Ayub, Q., Wei, W., Xue, Y., Tyler-Smith, C., Bafalluy, M. B., Martínez-Jarreta, B., Egyed, B., Balitzki, B., Tschumi, S., ... Roewer, L. (2014). A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Science International. Genetics*, 12, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.008>
- Remillard, E. M., Taylor, L. K., Layshock, J., Van Cuyk, S., y Omberg, K. M. (2013). Detecting laboratory DNA contamination using polyester-rayon wipes: a method

- validation study. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 358–365.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.003>
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., y Caramelli, D. (2012). Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 44, 21. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-21>
- Rohland, N., y Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., y Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205(1–2), 125–140. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00404-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00404-6)
- Vandewoestyne, M. (2011). Sources of DNA contamination and decontamination procedures in the forensic laboratory. *Journal of Forensic Research*, s2(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7145.S2-001>
- Watson, J. D., y Crick, F. H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18, 123–131.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020>
- Weyrich, L. S., Farrer, A. G., Eisenhofer, R., Arriola, L. A., Young, J., Selway, C. A., Handsley-Davis, M., Adler, C. J., Breen, J., y Cooper, A. (2019). Laboratory contamination over time during low-biomass sample analysis. *Molecular Ecology Resources*, 19(4), 982–996. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13011>
- Willerslev, E., y Cooper, A. (2005). Ancient DNA. *Proceedings. Biological Sciences / the Royal Society*, 272(1558), 3–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>
- Wilson-Wilde, L., Yakovchyts, D., Neville, S., Maynard, P., y Gunn, P. (2017). Investigation into ethylene oxide treatment and residuals on DNA and downstream DNA analysis. *Science & Justice : Journal of the Forensic Science Society*, 57(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2016.09.001>

Yang, Y., Xie, B., y Yan, J. (2014). Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics / Beijing Genomics Institute*, 12(5), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.09.001>

Yin, C., Liu, Y., Guo, X., Li, D., Fang, W., Yang, J., Zhou, F., Niu, W., Jia, Y., Yang, H., y Xing, J. (2019). An Effective Strategy to Eliminate Inherent Cross-Contamination in mtDNA Next-Generation Sequencing of Multiple Samples. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 21(4), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.02.006>

6.1. Leyes.

BOE-A-2004-16360 Real Decreto 1891/2004, de 10 de septiembre, por el que se crea la Comisión Interministerial para el estudio de la situación de las víctimas de la guerra civil y del franquismo. (n.d.). Retrieved June 6, 2024, from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2004-16360>

BOE-A-2007-12351 Ley 10/2007, de 22 de junio, de la lectura, del libro y de las bibliotecas. (n.d.). Retrieved June 6, 2024, from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-12351>

BOE-A-2007-22296 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. (n.d.). Retrieved June 6, 2024, from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-22296>

BOE-A-2022-17099 Ley 20/2022, de 19 de octubre, de Memoria Democrática. (n.d.). Retrieved June 6, 2024, from <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2022-17099>