



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

INFLUENCIA DE INHIBIDORES EN EL ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS PARA IDENTIFICACIÓN FORENSE EN EL CONTEXTO DE LA MEMORIA DEMOCRÁTICA EN ANDALUCÍA.

Autora: Sofía Arcediano Martos.

Grado: Biología.

Fecha: 24/06/2025



CREA



Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

INFLUENCIA DE INHIBIDORES EN EL ESTUDIO DE MARCADORES GENÉTICOS PARA IDENTIFICACIÓN FORENSE EN EL CONTEXTO DE LA MEMORIA DEMOCRÁTICA EN ANDALUCÍA.

Alumno/a: Sofía Arcediano Martos.

Jaén, junio, 2025

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA A PARTIR DE RESTOS ÓSEOS (RO)	2
1.1.1. <i>Tipos de identificación genética.</i>	2
1.1.2. <i>Marcadores genéticos utilizados.</i>	3
1.1.3. <i>Métodos de amplificación y detección del ADN.</i>	5
1.1.4. <i>Kits comerciales de amplificación empleados en genética forense.</i>	6
1.1.5. <i>Análisis e interpretación de los perfiles genéticos.</i>	7
1.2. LIMITACIONES EN EL ANÁLISIS GENÉTICO DE RESTOS ÓSEOS.	10
1.3. CONTEXTUALIZACIÓN HISTÓRICA Y RELEVANCIA FORENSE.	12
1.4. MARCO LEGAL Y NORMATIVO.	12
1.5. LABORATORIO DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA (LABIGEN) UGR.	13
1.5.1. <i>Control de calidad y prevención de contaminaciones.</i>	16
1.6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y RELEVANCIA.	16
2. OBJETIVOS.	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	17
3.1. INHIBIDORES.	17
3.1.1. <i>Ácido Húmico (AcHu).</i>	17
3.1.2. <i>Hidroxiapatita (HA).</i>	17
3.1.3. <i>Etanol.</i>	18
3.1.4. <i>Beads magnéticos.</i>	18
3.2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ADN.	18
3.2.1. <i>Muestra M5.</i>	18
3.2.2. <i>Muestra de Resto Óseo (RO).</i>	18
3.3. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DEL ADN.	19
3.3.1. <i>GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific).</i>	20
3.3.2. <i>YFiler™ Plus PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific).</i>	21
3.3.3. <i>PowerPlex® Fusion 6C System (Promega).</i>	22
3.3.4. <i>PowerPlex® Y23 System (Promega).</i>	23
3.3.5. <i>Kit Investigator Argus X-12 QS (Investigator, QIAGEN).</i>	24
3.4. ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DEL ADN.	25
3.5. ANÁLISIS DE PERFILES GENÉTICOS.	25

3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	26
3.6.1.	<i>Reproducibilidad de los alelos.</i>	27
3.6.2.	<i>Alturas de los alelos.</i>	27
3.6.3.	<i>Peak Height Ratios (PHR).</i>	27
4.	RESULTADOS.	28
4.1.	REPRODUCIBILIDAD DE LOS ALELOS.	28
4.1.1.	<i>Reproducibilidad Kit GlobalFiler IQC.</i>	28
4.1.2.	<i>Reproducibilidad Kit YFiler Plus.</i>	29
4.1.3.	<i>Reproducibilidad Kit PowerPlex Fusion 6C.</i>	30
4.1.4.	<i>Reproducibilidad Kit PowerPlex Y23.</i>	31
4.1.5.	<i>Reproducibilidad Kit Investigator Argus X-12 QS.</i>	32
4.2.	ALTURA DE LOS ALELOS.	33
4.2.1.	<i>Alturas Kit GlobalFiler IQC.</i>	33
4.2.2.	<i>Alturas Kit YFiler Plus.</i>	33
4.2.3.	<i>Alturas Kit PowerPlex Fusion 6C.</i>	34
4.2.4.	<i>Alturas Kit PowerPlex Y23.</i>	35
4.2.5.	<i>Alturas Kit Investigator Argus X-12 QS.</i>	35
4.3.	PEAK HEIGHT RATIOS (PHR).	36
4.3.1.	<i>PHR Kit GlobalFiler IQC.</i>	36
4.3.2.	<i>PHR Kit YFiler Plus.</i>	37
4.3.3.	<i>PHR Kit PowerPlex Fusion 6C.</i>	37
4.3.4.	<i>PHR Kit PowerPlex Y23.</i>	37
4.3.5.	<i>PHR Kit Investigator Argus X-12 QS.</i>	38
5.	DISCUSIÓN.	38
6.	CONCLUSIONES.	40
7.	BIBLIOGRAFÍA.	41
8.	APÉNDICE.	46

ABSTRACT.

This study evaluates the stability and reproducibility of five widely used commercial multiplex PCR kits in forensic genetics, and their performance in the presence of four common inhibitors typically found in such samples. The kits GlobalFiler IQC, YFiler Plus, PowerPlex Fusion 6C, PowerPlex Y23, and Argus X-12 QS were tested under the influence of hydroxyapatite (HA), humic acid (AcHu), ethanol, and magnetic beads, during the DNA amplification from a reference sample and a skeletal remain, provided by the LABIGEN (UGR) DNA bank. Results show that magnetic beads and ethanol were the most detrimental, causing errors or complete loss of genetic information, while HA and AcHu had milder effects. GlobalFiler IQC, YFiler Plus, and PowerPlex Fusion 6C were the most resistant kits. This study contributes to the optimization of genetic identification protocols for forensic samples in the Democratic Memory in Andalucía context, aiding the identification of Spanish Civil War and post-war victims. **Keywords:** genetic identification, PCR inhibitors, democratic memory, skeletal remains, reference samples, degraded DNA.

RESUMEN.

En este trabajo se evalúan la estabilidad y reproducibilidad de cinco kits comerciales de PCR multiplex de amplio uso en genética forense, y su respuesta frente a la presencia de cuatro inhibidores comunes en muestras de este tipo. Los kits GlobalFiler IQC, YFiler Plus, PowerPlex Fusion 6C, PowerPlex Y23 y Argus X-12 QS fueron expuestos a hidroxapatita (HA), ácido húmico (AcHu), etanol y beads magnéticos durante la amplificación del ADN de una muestra de referencia y una de resto óseo, ambas del banco de ADN de LABIGEN (UGR). Los resultados muestran que los beads y el etanol fueron los más perjudiciales en las concentraciones empleadas, generando errores de interpretación e incluso pérdida total de información genética. La HA y el AcHu tuvieron efectos más leves. GlobalFiler IQC, YFiler Plus y PowerPlex Fusion 6C fueron los kits más resistentes. Este estudio contribuye a optimizar los protocolos de identificación genética de muestras forenses en el contexto de la Memoria Democrática en Andalucía, mejorando la fiabilidad de las identificaciones de víctimas de la Guerra Civil y la posguerra.

Palabras Clave: identificación genética, inhibidores de PCR, memoria democrática, restos óseos, muestras de referencia, ADN degradado.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Identificación genética a partir de restos óseos (RO).

La identificación genética es una herramienta crucial en diversos ámbitos como la medicina forense, la antropología forense, la genealogía, la investigación criminal, la identificación de víctimas en catástrofes y los derechos humanos. Los procesos técnicos realizados para la identificación genética de un individuo permiten la asociación de restos humanos a individuos mediante el estudio del material genético, a través de distintos análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico). Se trata de un método especialmente útil en contextos donde los métodos tradicionales de identificación, como las huellas dactilares o el reconocimiento visual, no son viables (Alvarez-Cubero et al., 2012; Budowle et al., 2005).

En España, la identificación genética ha cobrado un papel fundamental en la búsqueda de personas desaparecidas durante la Guerra Civil y la posguerra, constituyéndose como un procedimiento clave en los procesos de recuperación de la memoria histórica y democrática.

1.1.1. Tipos de identificación genética.

Existen dos métodos principales para la identificación genética:

- La identificación directa, basada en la comparación del perfil genético obtenido de los restos con el ADN extraído de objetos personales del desaparecido, consiguiendo perfiles coincidentes cuando hay una identificación.
- La identificación indirecta se basa en comparar los perfiles genéticos obtenidos de muestras de RO con los perfiles procedentes de muestras proporcionadas por familiares biológicos, denominadas muestras de referencia (MR).

Este último método es el más empleado en los procesos de identificación de individuos de exhumación ya que rara vez se dispone de objetos personales de las víctimas que permitan extraer su propio ADN y realizar una identificación directa (*I-Familia*, s. f.).

Es importante la diferencia entre los términos víctima e individuo. Se considera víctima a una persona desaparecida de la que se dispone información previa, como nombre y apellidos, características fenotípicas o familiares. Mientras que individuo es como se

denomina a los restos pertenecientes a una persona desconocida que han sido recuperados en una fosa, de los cuales solo se conocen datos genéticos, características genotípicas y datos antropométricos que podrían asociarse a los de una víctima. Los perfiles genéticos obtenidos se recopilan en una base de datos para realizar las comparaciones entre los perfiles de RO y los de las MR, obteniendo coincidencias que pueden ser consideradas para una posible identificación.

1.1.2. Marcadores genéticos utilizados.

En el contexto de la identificación genética de personas desaparecidas durante la Guerra Civil española y la posguerra, se realiza un análisis genético basado principalmente en ADN nuclear. Ocasionalmente, en los casos en los que la relación de familiaridad lo permite, se incorpora el análisis de ADN mitocondrial (ADNmt).

El procedimiento preestablecido se basa en el estudio de marcadores polimórficos de alta variabilidad, siendo los más utilizados las repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeats*, STR), tanto autosómicos, como ligados a los cromosomas sexuales. Los STR consisten en secuencias cortas (2-6 pares de bases) de ADN repetidas en tándem, que presentan alta variabilidad entre individuos, permitiendo altas tasas de discriminación entre ellos y facilitando las identificaciones (Alvarez-Cubero et al., 2012; Lorente et al., 2000; Sullivan et al., 1992).

Estos marcadores han sido ampliamente validados y reconocidos en el ámbito forense y permiten una alta resolución en la comparación genética, y por tanto se encuentran incluidos en los estándares internacionales vigentes, como el nuevo estándar de la Unión Europea (establecido en la resolución del Consejo de Europa de 30 de noviembre de 2009, relativa al intercambio de resultados de análisis de ADN, 2009/C 296/01) y el estándar CODIS (*Combined DNA Index System*) del Departamento de Justicia de los Estados Unidos (*CODIS Archive*, s. f.; Starinsky-Elbaz et al., 2020).

Dependiendo del grado y tipo de parentesco entre la víctima y el familiar de referencia, se realizan análisis de marcadores específicos. En casos donde la relación es entre varones, como padre e hijo, o hermanos de padre y madre, resulta especialmente útil el análisis adicional de marcadores STR localizados en el cromosoma Y (Y-STR) para

establecer la línea paterna, ya que el haplotipo hemicigótico del cromosoma Y se transmite exclusivamente por línea paterna sin recombinación entre generaciones (Kayser, 2017). En las situaciones que implican a mujeres, como hermanas de madre y padre, o madre-hija/o, pueden utilizarse también marcadores STR localizados en el cromosoma X (X-STR), que aportan información adicional relevante, especialmente cuando la relación de parentesco no puede resolverse únicamente con STR autosómicos. (Sullivan et al., 1992; Xiao et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Ocasionalmente, cuando la relación de familiaridad lo permite, como ocurre con hermanos/as, hijos/as, u otros parientes que comparten línea materna, se incorpora el análisis de ADNmt como complemento al análisis de ADN nuclear. Su utilidad es especialmente relevante en situaciones donde el material genético está altamente degradado y no se logra obtener un perfil nuclear completo. Aun así, es importante destacar que el ADNmt no es concluyente por sí mismo, ya que únicamente permite establecer coincidencias dentro de la línea materna, pero sin determinar el grado exacto de parentesco (Cooley, 2023; Sullivan et al., 1992).

En muchos casos, además de los análisis previamente mencionados, es necesario realizar también el tipaje de los mini-STRs (incluyendo amplicones cortos de ADNmt y de cromosoma X) cuando se considere necesario por el estado de degradación del ADN obtenido y/o el tipo de muestras de referencia. Este tipo de marcadores STR se caracterizan por tener un tamaño de alrededor de 100 pares de bases (pb), lo que facilita la recuperación de la información genética que pueda perderse en otros tipos de STRs de mayor tamaño (Coble & Butler, 2005; Fernández, s. f.).

Finalmente, en los casos en los que las muestras de RO estén tan degradadas que no se pueda obtener información genética mediante los STRs, se podrían analizar otros tipos de polimorfismos de pequeño tamaño como los polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) o Indels, con el fin de corroborar o excluir la relación de familiaridad (Budowle & van Daal, 2008).

La adaptación de este tipo de estrategias al establecer los análisis y adaptarlos a cada tipo de relación familiar ha sido fundamental para avanzar en los procesos de identificación genética.

1.1.3. Métodos de amplificación y detección del ADN.

El proceso de análisis comienza con la extracción y purificación del ADN, seguida por su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). La PCR permite la amplificación de regiones específicas del ADN, incluso a partir de cantidad y calidad deficientes. En concreto, la PCR multiplex, una técnica ampliamente utilizada en procedimientos de genética forense, permite amplificar simultáneamente múltiples loci en una sola reacción a partir de reducidas cantidades de ADN, lo que minimiza tiempo y recursos (Alaeddini et al., 2010; Cupples Connon, 2023). Cada pareja de oligonucleótidos (*primers*) está diseñada para un locus específico y lleva incorporado un marcador fluorescente, generalmente en el *forward*, lo que permite detectar los productos amplificados en la etapa posterior de electroforesis capilar mediante señales de fluorescencia diferenciadas por color.

Tras la PCR, el análisis de los fragmentos STR amplificados se realiza normalmente por electroforesis capilar (EC), una técnica que permite separar los fragmentos de ADN marcados con fluorocromos en función de su tamaño y fluorescencia. Las muestras se introducen en capilares rellenos de polímeros específicos que actúan como un tamiz molecular, permitiendo la migración diferencial de los fragmentos según su longitud y carga eléctrica, entre el ánodo y el cátodo. La señal emitida por los marcadores fluorescentes incorporados en los primers es detectada por el sistema de lectura del equipo, lo que permite asignar cada fragmento a su locus correspondiente. Para la visualización y el análisis detallado de los resultados, se emplean softwares específicos mediante el cual se generan electroferogramas, la representación gráfica del resultado de una EC (Figura 1.1), donde cada pico representa un alelo (Shewale et al., 2012).

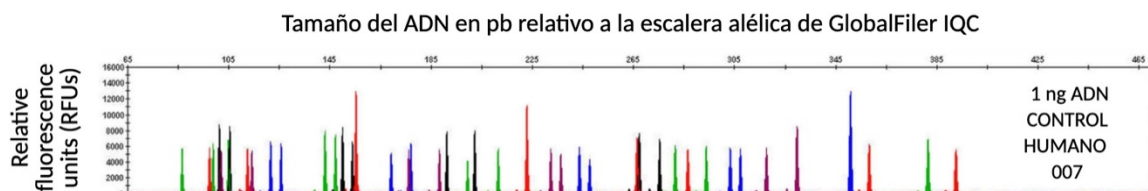


Figura 1.1. Electroferograma obtenido a partir de una muestra de ADN control humano 007. Fuente: adaptación de Ludeman et al., 2018.

Aunque actualmente la mayor parte de los análisis y detección de marcadores de ADN forenses se realizan mediante PCR y EC, en las últimas décadas se han implementado novedosas técnicas en el ámbito de la identificación genética conocidas como secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequencing*, NGS) con numerosas ventajas, como la capacidad de análisis simultáneo de un mayor número de marcadores de ADN, y por tanto, un incremento considerable del poder de discriminación del análisis genético (Alvarez-Cubero et al., 2017; Aly & Sabri, 2015).

1.1.4. Kits comerciales de amplificación empleados en genética forense.

Para la amplificación de los marcadores de interés en procesos de identificación genética se emplean los mismos kits comerciales de PCR multiplex usados en genética forense, y se hizo una selección de 5 kits que se emplean de manera rutinaria en los laboratorios de identificación genética por su versatilidad y su aplicabilidad al caso. Estos kits cumplen con los estándares internacionales de la Unión Europea y el sistema CODIS del Departamento de Justicia de los EE. UU. Las características de los marcadores STR incluidos en estos kits se encuentran en el Apéndice 1.

El kit de amplificación de PCR GlobalFiler™ IQC es un kit STR de 24 loci autosómicos y 6 colorantes que combina la máxima compatibilidad con los estándares de loci de bases de datos globales. Además, contiene un sistema de control de calidad interno (*Internal Quality Control*, IQC) que ayuda a maximizar la recuperación de información y a mejorar la eficiencia general (*GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit*, s. f.).

YFiler™ Plus (ThermoFisher Scientific) permite la amplificación múltiple de los 17 marcadores Y-STR incluidos en los kits de amplificación AmpFLSTR Yfiler PCR, así como 10 Y-STR adicionales, utilizando una química de 6 colorantes, proporcionando una alta capacidad de discriminación. La inclusión de siete Y-STR de rápida mutación, con tasas de mutación superiores a 1×10^{-2} , mejora la resolución para diferenciar líneas paternas y discriminar entre varones estrechamente relacionados (*Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit*, s. f.).

El sistema PowerPlex® Fusion 6C permite la coamplificación de 27 loci autosómicos, X-STRs y Y-STRs, incluyendo los marcadores CODIS, ESS, Amelogenina, DYS391 y

loci adicionales como Penta D, Penta E, SE33 y dos Y-STR de rápida mutación. Es compatible con bases de datos internacionales y ofrece alta eficacia en análisis forenses, de paternidad y relaciones biológicas (*PowerPlex® Fusion 6C System*, s. f.).

El sistema PowerPlex® Y23 (Promega) es un multiplex Y-STR de 23 loci y 5 colorantes, diseñado para muestras forenses, de bases de datos y de paternidad. Su alta capacidad de discriminación promete reducir falsos positivos y mejorar la interpretación de los perfiles genéticos (*PowerPlex® Y23 System*, s. f.).

El kit Argus X-12 QS (QIAGEN) permite la amplificación múltiple de 12 X-STRs además del marcador de alineación autosómico D21S11 (cromosoma 21), con gran poder de discriminación que ayuda a evitar confusiones entre muestras, y la amelogenina, para la determinación del sexo (cromosomas X e Y). También incluye un sensor de calidad interno (*Quality Surveillance*, QS) que promete garantizar la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos. El kit cumple los requisitos de la norma ISO 18385 (*Kit Investigator Argus X-12 QS*, s. f.).

1.1.5. Análisis e interpretación de los perfiles genéticos.

Un perfil genético o huella genética es la representación del conjunto específico de alelos presentes en diferentes locus genéticos, que permiten distinguir de forma única a cada individuo. Estos perfiles se obtienen y visualizan mediante electroferogramas, gráficos que muestran picos correspondientes a los fragmentos de ADN amplificados, ordenados por tamaño y diferenciados gracias a fluorocromos que permiten su detección mediante electroforesis capilar (Jeffreys, 2005).

La interpretación de estos perfiles requiere un análisis detallado y cuidadoso, ya que pueden estar influidos por factores técnicos, inhibidores, o el propio estado del ADN. Para garantizar unos resultados fiables, se emplean parámetros validados internamente, junto con el conocimiento de posibles artefactos que pueden interferir en la lectura e interpretación de los datos.

Los parámetros clave en la interpretación son los siguientes:

- Unidades relativas de fluorescencia (*Relative Fluorescence Units*, RFU): es la medida de la intensidad de fluorescencia registrada en un electroferograma. Cuanto mayor sea la RFU, mayor es la cantidad de producto amplificado. Este valor permite valorar la calidad de la señal y detectar posibles inhibiciones si se observan intensidades anormalmente bajas en los alelos esperados.
- Umbral Analítico (UA): es el valor mínimo de RFU a partir del cual un pico es considerado potencialmente válido. Los picos por debajo del UA se interpretan como ruido de fondo y no se tienen en cuenta como alelos en el perfil.
- Umbral Estocástico (UE): representa el nivel mínimo de fluorescencia necesario para asegurar que ambos alelos de un locus heterocigoto están presentes. Por debajo del UE, no se puede descartar la pérdida de uno de los alelos, fenómeno conocido como *dropout* alélico, lo cual puede llevar a una lectura incompleta o errónea del genotipo.
- Altura de los alelos: en muestras degradadas o con baja concentración de ADN (como los RO), es crucial monitorizar la altura de los alelos. Una disminución significativa puede indicar la presencia de inhibidores, y si la intensidad cae por debajo del UE, puede producirse *dropout* alélico, afectando la fiabilidad del perfil y dificultando los cotejos posteriores.
- Relación entre alturas de alelos heterocigóticos (*Peak Height Ratios*, PHR): es la relación entre las alturas de los dos alelos en un locus heterocigoto. Se calcula dividiendo la altura del pico menor entre la del mayor y multiplicando el resultado por 100. Un PHR de 100% indica un equilibrio perfecto entre ambos alelos; mientras que valores bajos pueden reflejar problemas de amplificación, como inhibición o pérdida parcial del ADN. Cada laboratorio establece sus propios umbrales de PHR válidos, por debajo de los cuales no se considera fiable la asignación de un genotipo heterocigoto.

Durante el análisis de perfiles, pueden observarse ciertos fenómenos que pueden afectar la lectura:

- *Dropout* alélico: pérdida de uno de los alelos en un genotipo heterocigoto, común en muestras degradadas o inhibidas. Puede llevar a interpretar erróneamente un heterocigoto como homocigoto.
- *Stutter*: picos secundarios generados por deslizamiento de la ADN polimerasa durante la amplificación. Suelen aparecer asignados como un nuevo alelo por debajo o por encima del alelo principal y pueden confundirse si no se interpretan correctamente.
- *Pull-up*: artefactos fluorescentes generados por saturación en la señal de un canal, que se proyectan en canales adyacentes. Esto produce picos falsos frecuentemente cuando hay señales de alta intensidad.
- *Off Ladder* (OL): alelos que se encuentran fuera del rango de la escala alélica proporcionada por el kit. Pueden deberse a mutaciones, artefactos o errores técnicos y requieren análisis adicional para determinar su validez.
- Ruido de fondo y artefactos: son picos no específicos, señales eléctricas o distorsiones del electroferograma que no corresponden a productos de amplificación reales. Aunque generalmente se encuentran por debajo del UA, pueden confundirse con alelos verdaderos si no se identifican correctamente.

El análisis de perfiles genéticos debe realizarse considerando todos estos aspectos, especialmente en el contexto de muestras complicadas como los restos óseos antiguos, donde los inhibidores, la degradación y la baja concentración de ADN comprometen la interpretación. Evaluar la reproducibilidad es una buena opción que permite detectar la obtención de perfiles consistentes en distintas repeticiones que aseguren confiabilidad y precisión al asignar un perfil consistentemente en distintas repeticiones. Además, la validación de parámetros como el UA, UE y PHR también es esencial para asegurar perfiles precisos, reproducibles y legalmente válidos.

1.2. Limitaciones en el análisis genético de restos óseos.

Las principales dificultades a las que se enfrenta el proceso de identificación de los restos óseos (RO) exhumados son la escasa cantidad de ADN debido a la degradación, la presencia de inhibidores y la susceptibilidad de contaminación con ADN exógeno.

Tras la muerte, los RO sufren procesos de descomposición y diagénesis los cuales alteran su estructura, composición y estado de conservación (Scorrano et al., 2015; Tuross, 1994). El ADN endógeno de los restos que permite la identificación de la víctima se ve gravemente afectado por factores tanto intrínsecos como ambientales que contribuyen a su pérdida y degradación, entre ellos, la exposición al calor, la humedad, la luz ultravioleta, el fuego o el contacto con agua salada (Ambers, 2023). Además, la presencia de contaminantes también afecta a la integridad del material genético contenido en los RO. Estos pueden proceder del entorno donde se encontraban enterrados los restos (por ejemplo, los ácidos del suelo, sales, compuestos químicos o la actividad microbiana), o pueden generarse durante el proceso de exhumación (por manipulación sin las precauciones adecuadas o por instrumental no esterilizado).

A estos factores se les suma la presencia de inhibidores, que representan uno de los principales obstáculos en la obtención de perfiles genéticos fiables en el contexto de identificación genética de RO ya que su presencia compromete la recuperación de la información genética y dificulta o impide la amplificación del ADN mediante PCR.

En este trabajo se seleccionaron cuatro sustancias comúnmente presentes en restos óseos antiguos o utilizadas en los procesos de extracción en el laboratorio (Alaeddini, 2012). Estos inhibidores son la hidroxiapatita cálcica (HA), el ácido húmico (AcHu), el etanol y los beads magnéticos. Estos compuestos están comúnmente presentes en muestras de exhumación como es el caso de la HA y del AcHu, o pueden quedar restos de alguno de ellos tras el tratamiento de laboratorio que produzcan inhibición si no son eliminados correctamente, como el etanol y los beads. Por tanto, resulta fundamental evaluar el efecto de estos inhibidores en distintos kits de amplificación empleados en contextos forenses.

La Hidroxiapatita cálcica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es el componente natural y mayoritario en huesos y dentición humana, constituida por cristales de fosfato cálcico en una matriz proteica (Collins et al., 2002; Grunenwald et al., 2014). La HA actúa como una barrera química que previene la degradación del ADN al tener la capacidad de adsorberlo creando una fuerte interacción electrostática entre los grupos fosfato cargados negativamente del ADN y los iones de calcio cargados positivamente de la superficie de la HA (Okazaki et al., 2001; Paget et al., 1992). Esta interacción, aunque ayuda a prevenir cierta parte de la degradación del ADN en muestras óseas antiguas, también podría interferir en la amplificación de este ADN al impedir la unión entre la ADN polimerasa y la hebra de ADN a la que se encuentra unida. En el proceso de extracción y purificación del ADN se trata el pulverizado del RO con tampón EDTA a 0'5 M para decalcificar la muestra, retirando la HA (Tuross, 1994). Aun así, surgen dudas de si la retirada de la HA es completa o si quedan restos de esta apatita adheridos al ADN.

El Ácido Húmico (AcHu) es el componente principal del humus del suelo producidos por la reacción de Maillard, que se trata de una reacción de oxidación bioquímica entre grupos amino y carbonilo de azúcares reducidos como la glucosa (Alaeddini, 2012), y se ha demostrado sus efectos contaminantes y degradativos sobre el ADN debido a su pH ácido (Sidstedt et al., 2020; Sutlovic et al., 2008; Tebbe & Vahjen, 1993). Por tanto, este compuesto está presente en los huesos obtenidos de las exhumaciones y sus restos son un claro inhibidor de PCR debido a su capacidad de interferir en la actividad de la ADN polimerasa.

El etanol se usa habitualmente en los procesos de purificación del ADN, y sus restos cuando no se elimina completamente pueden interferir en la amplificación mediante PCR (Rossen et al., 1992; Schrader et al., 2012a).

Los beads magnéticos se usan en la extracción del ADN mediante la técnica Magnetic Bead-based extraction con el kit comercial PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit-Magnetic Particles (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific), y aunque han demostrado ser un método efectivo para eliminar otros inhibidores antes de la PCR (Maher et al., 2001; Schrader et al., 2012b), se quiere evaluar si los residuos que puedan quedar en las muestras tras ser purificadas puedan afectar a la amplificación.

1.3. Contextualización histórica y relevancia forense.

La recuperación de la memoria histórica en España ha sido, además de un proyecto social, humanitario y político, un verdadero reto científico. La necesidad de identificar a las personas desaparecidas durante la Guerra Civil y la Posguerra para zanjar hitos históricos ha impulsado proyectos en los que las disciplinas como la historia, arqueología y genética forense colaboran estrechamente.

En este contexto, las técnicas aplicadas de genética forense se han convertido en una herramienta clave para los procesos de identificación. El desarrollo de métodos cada vez más sensibles y precisos han permitido abordar casos que durante mucho tiempo se consideraban irresolubles por el deterioro de las muestras o la falta de información.

Estos avances han sido fundamentales en programas como el de recuperación de la memoria histórica y, más recientemente, el de memoria democrática. Ambos han promovido la coordinación de equipos multidisciplinares dedicados a la localización, exhumación e identificación de víctimas del conflicto y la represión.

Andalucía ha sido una de las comunidades autónomas con mayor actividad en este ámbito, debido a su extensión geográfica, su densidad poblacional y el elevado número de fosas comunes documentadas. En este proceso, los laboratorios de identificación genética desempeñan un papel esencial, ya que proporcionan las herramientas necesarias para recuperar la identidad de las víctimas, ofrecer respuestas a las familias y contribuir a los principios de verdad, justicia y reparación.

1.4. Marco legal y normativo.

La obtención de perfiles genéticos es una de las herramientas más usadas en el proyecto de la recuperación de las víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra. La base legal que sustenta este tipo de estudios se apoya en normativas como el Orden de Consejería de Justicia y Administración Pública, de 7 septiembre 2009, en la que se aprueba el Protocolo Andaluz de actuación en exhumaciones de víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra en el BOJA. Además de la Ley 52/2007, de 26 de diciembre, por la que se reconocen y amplían derechos y se establecen medidas en favor de quienes padecieron persecución o violencia durante la guerra civil y la dictadura (BOE-A-2007-

22296). Respaldo por el Real Decreto 1977/2008, de 28 de noviembre, por el que se regula la composición y funciones de la Comisión Nacional para el uso forense del ADN (BOE-A-2008-19992).

Más recientemente se aprobó la última ley nacional con respecto a la memoria democrática, la Ley 20/2022, de 19 de octubre, de Memoria Democrática (BOE-A-2022-17099), corregida en febrero de 2023 (BOE-A-2023-3123), que regula la creación de una base de datos nacional de ADN para este proyecto, basado también en el documento oficial de “Recomendaciones sobre los estudios de identificación genética de víctimas de la guerra civil española”. En base a esta ley, debe considerarse que este suceso histórico debe ser estudiado de forma imparcial con el objetivo de aumentar el conocimiento científico y la identificación de las personas que fueron perseguidas, ejecutadas y enterradas en fosas comunes en aquellos años.

La incorporación de estándares internacionales como el sistema CODIS y los STRs recomendados por la Unión Europea refuerzan la trazabilidad y la calidad de los análisis realizados, especialmente cuando estos pertenecen a iniciativas institucionales de reparación y justicia.

Además, organismos como el SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) y el ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*), respaldando la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, ofrecen guías técnicas y recomendaciones específicas para la validación de procedimientos forenses, la interpretación de resultados y el control de calidad en los laboratorios. Garantizando así la calidad, fiabilidad y validez jurídica de los perfiles genéticos obtenidos bajo su cumplimiento.

1.5. Laboratorio de identificación genética (LABIGEN) UGR.

El Laboratorio de Identificación Genética (LABIGEN), perteneciente al Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la Universidad de Granada, está especializado en el análisis genético con fines forenses y humanitarios. Ha sido pionero en la creación de bases de datos genéticas que han tenido un importante impacto a nivel internacional.

Entre sus principales iniciativas se encuentran los proyectos Fénix, DNA-Prokids y DNA-Pro-Organs. El proyecto Fénix (1998) se centra en la identificación de personas desaparecidas y restos cadavéricos mediante el cotejo de perfiles genéticos entre familiares y restos no identificados. DNA-Prokids (2004) combate la trata de personas, especialmente de menores, utilizando la genética para identificar a víctimas y facilitar la reunificación familiar. DNA-Pro-Organs (2016) se enfoca en prevenir el tráfico ilegal de órganos, permitiendo la identificación genética de donantes y receptores.

Actualmente, la principal línea de trabajo de LABIGEN es el proyecto de Memoria Histórica y Democrática, enmarcado en la Ley 52/2007, que reconoce los derechos de las víctimas de la Guerra Civil y la Dictadura Franquista. Esta ley establece la responsabilidad de las administraciones públicas en la localización e identificación de los desaparecidos, garantizando a sus familiares la reparación moral y simbólica.

En Andalucía, una de las regiones más afectadas por la represión, se aprobó en 2009 el Protocolo Andaluz de actuación en exhumaciones, que regula todo el proceso de recuperación de restos, desde la exhumación hasta el análisis genético. Este protocolo establece también la recogida de muestras de referencia de familiares, la custodia de restos y la coordinación entre arqueólogos, antropólogos y genetistas forenses.

En este marco, LABIGEN colabora con la Junta de Andalucía mediante un convenio que le autoriza a realizar la extracción y análisis de ADN de restos óseos procedentes de fosas comunes, con el objetivo de cotejarlos con muestras de referencia de familiares. Este trabajo ha dado lugar al desarrollo del Banco de ADN de víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra, fundamental en los procesos de identificación que brindan soporte técnico y científico al proyecto.

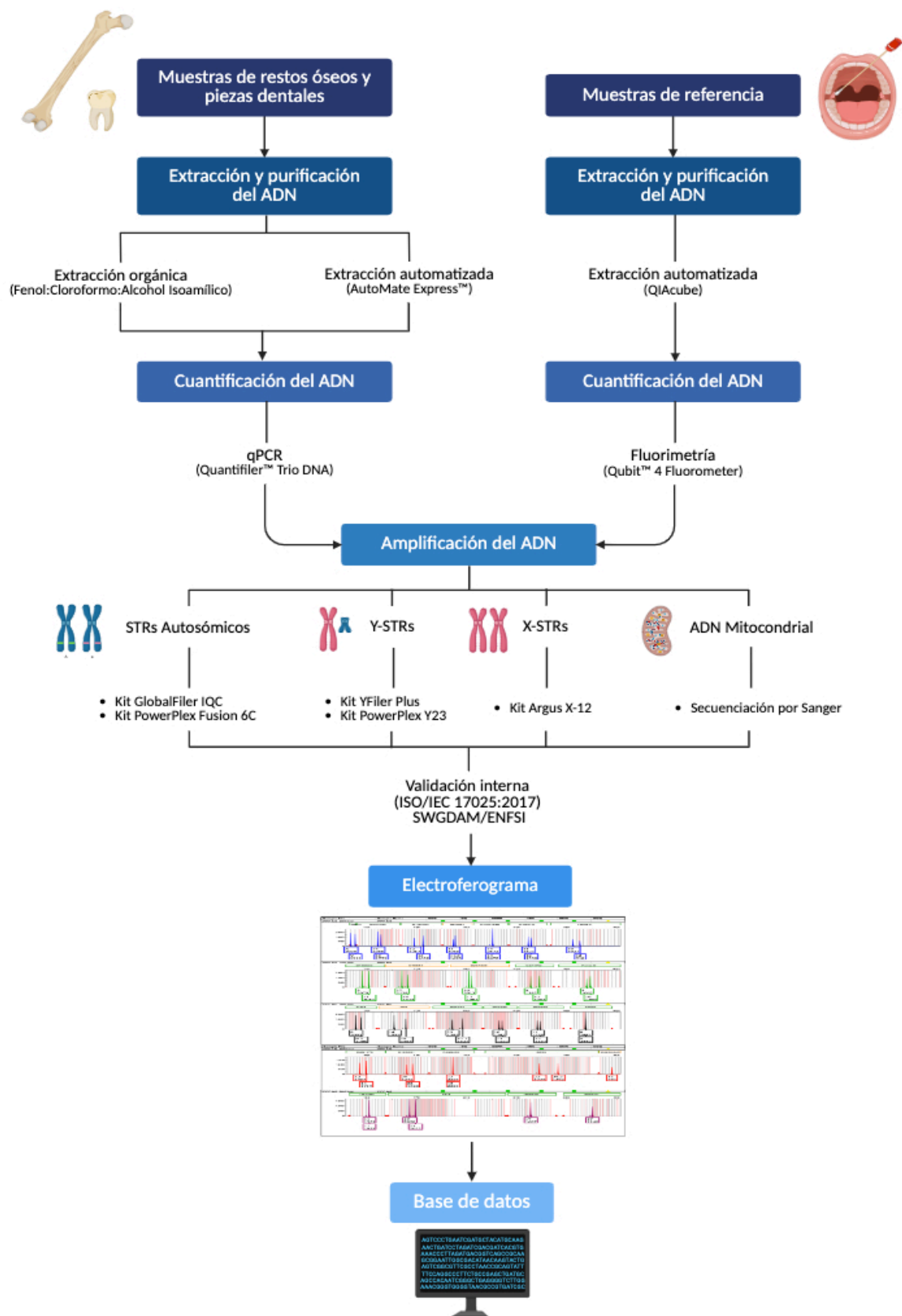


Figura 1.2. Flujo de trabajo del Laboratorio de Identificación Genética (LABIGEN) de la UGR. Fuente: elaboración propia (2025) con <https://BioRender.com>

1.5.1. Control de calidad y prevención de contaminaciones.

Debido a la cantidad deficiente y el elevado grado de fragmentación del ADN en las muestras de RO, durante el proceso experimental se adoptan estrictos protocolos de prevención de contaminaciones, validados internamente y que siguen las recomendaciones para trabajos con ADN antiguo, asegurando la autenticidad e integridad de los resultados (Cooper & Poinar, 2000; Pääbo et al., 2004).

Todas las manipulaciones de muestras se realizaron en áreas de trabajo físicamente aisladas, dedicadas exclusivamente al procesamiento de ADN de restos óseos. Se realizaron controles negativos tanto en las fases de extracción como de amplificación para detectar contaminaciones ambientales o de procedimiento. Cuando el volumen de muestra lo permitió, se efectuaron extracciones independientes replicadas, así como amplificaciones duplicadas de las regiones de interés para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Se priorizó la amplificación de fragmentos pequeños, maximizando la recuperación de ADN endógeno fragmentado y minimizando el sesgo de amplificación de ADN exógeno contaminante. Además, las superficies óseas fueron descontaminadas mediante abrasión física y tratamiento con radiación ultravioleta (Hofreiter et al., 2001; Pääbo et al., 1990; Scorrano et al., 2015).

Estas medidas garantizan la autenticidad de los perfiles genéticos, permitiendo descartar artefactos derivados de contaminación, daño molecular o eventos de *PCR jumping* que ocurren cuando la polimerasa cambia de molde durante la amplificación generando productos quiméricos. Este fenómeno es frecuente en muestras que presentan altas tasas de degradación del ADN (Pääbo et al., 1990).

1.6. Justificación del estudio y relevancia.

Dado el interés social, histórico y jurídico de los procesos de identificación genética en el marco de la Memoria Democrática, es fundamental validar los protocolos empleados frente a condiciones adversas, como la presencia de inhibidores, que añaden dificultades en la obtención de perfiles genéticos de RO.

Por ello, este trabajo parte de la necesidad de validar técnicamente los protocolos de identificación, asegurando su utilidad práctica y su respaldo legal. Para ello, se evalúa

el efecto de diferentes inhibidores sobre la amplificación del ADN extraído, utilizando varios kits comerciales de uso habitual en genética forense, con el fin de valorar su estabilidad y resistencia frente a este tipo de interferencias.

2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es evaluar la estabilidad y reproducibilidad de la información genética obtenida a partir de muestras de referencia y de restos óseos con kits comerciales de PCR multiplex de uso habitual en genética forense, valorando su respuesta en presencia de diferentes inhibidores comunes en procesos de identificación genética.

En concreto, se evalúa la estabilidad y reproducibilidad en presencia de inhibidores como la hidroxiapatita (HA), el ácido húmico (AcHu), el etanol y los beads magnéticos, mientras que los kits comerciales de amplificación genética multiplex que se compararán son Global Filer IQC, Y Filer Plus, PowerPlex Fusion 6C, PowerPlex Y23 y Argus X-12 QS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Inhibidores.

Con el objetivo de evaluar el impacto de distintos inhibidores sobre la estabilidad y eficiencia en la amplificación del ADN mediante PCR, se añadieron estos compuestos de forma controlada a las reacciones de amplificación en distintas concentraciones.

3.1.1. Ácido Húmico (AcHu).

Para este estudio se empleó ácido húmico de grado analítico (Sigma-Aldrich) en dos concentraciones:

- 100 ng/μL (AcHu C1).
- 300 ng/μL (AcHu C2).

3.1.2. Hidroxiapatita (HA).

Se utilizó HA (Sigma-Aldrich) en las siguientes concentraciones:

- 100 ng/μL (HA C1).
- 300 ng/μL (HA C2).

3.1.3. Etanol.

Se empleó el etanol al 96% (Avantor®, VWR). Para su evaluación como inhibidor, se añadió 1 µL directamente del envase comercial a la mezcla de amplificación con un volumen final de 25 µL.

3.1.4. Beads magnéticos.

Los beads están incluidos en el kit PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit-Magnetic Particles (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific). En este estudio se añadió 1 µL directamente del reactivo comercial a la mezcla de PCR con un volumen final de 25 µL. La concentración exacta de partículas no está especificada por el fabricante.

3.2. Obtención de los extractos de ADN.

Los extractos de ADN de las muestras usadas para la valoración de la estabilidad de los kits mencionados anteriormente provienen del banco de ADN de LABIGEN.

3.2.1. Muestra M5.

La muestra M5, procedente de un hisopado bucal proporcionado por personal del laboratorio, se empleó como una muestra representativa similar a las muestras de referencia (MR) obtenidas de los familiares de las víctimas. Estas contienen por normal general una buena cantidad y calidad de ADN, sin presentar signos de degradación. El proceso de extracción fue realizado previamente siguiendo el protocolo específico e interno del propio LABIGEN (con código PE-ADN-022-AUMR). Consiste en una extracción automatizada con el equipo QIAcube (QIAGEN), empleando el kit de extracción QIAamp® DNA Investigator (QIAGEN). También se determinó la concentración de esta muestra mediante un ensayo de fluorimetría utilizando el equipo Qubit™ 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific), y usando el Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, específico para ADN de doble cadena en bajas concentraciones (*High Sensitivity*). La concentración de ADN para la muestra M5 fue de 6,7 ng/µL.

3.2.2. Muestra de Resto Óseo (RO).

Esta muestra de RO proviene de una de las fosas exhumadas en el marco de la memoria democrática. El RO fue previamente limpiado y pulverizado según el

protocolo de LABIGEN con código PE-ADN-040-PROD, para posteriormente realizar la extracción y purificación del ADN según el protocolo PE-ADN-043-PHCL. Este se basa en una extracción orgánica con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y luego concentrado con filtros de ultracentrífuga Amicon ultra-4 30 kDa (Sigma-Aldrich). Además, se realizó una repurificación usando el QIAamp MinElute Kit (QIAGEN). La concentración también fue estimada previamente mediante una qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real), obteniendo una concentración de ADN de 4,83 ng/ μ L.

3.3. Amplificación múltiple del ADN.

La amplificación de las muestras se realizó mediante PCR multiplex, empleando cinco kits comerciales usados normalmente en genética forense para validar la estabilidad de los perfiles genéticos resultantes frente a los distintos inhibidores. Todos los kits se usaron siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes para las reacciones de PCR a volumen completo (25 μ L).

Para las reacciones de las MR se emplea 1 μ L del ADN a una concentración de 0,5 ng/ μ L. Esta cantidad de ADN es suficiente para obtener perfiles genéticos completos sin mostrar artefactos, ya que la calidad de la muestra es buena y no presenta signos de degradación. Por otro lado, en las muestras de RO se emplea 1 μ L del ADN en su concentración original de 4,83 ng/ μ L para remediar la degradación sufrida e intentar mitigar todo lo posible sus efectos.

En cada kit, tanto para M5 como la muestra de RO, se empleó la muestra control (sin inhibidor), con AcHu C1, AcHu C2, HA C1, HA C2, etanol y beads magnéticos, resultado 7 reacciones por PCR. En ambos casos se añade 1 μ L de cada inhibidor en el propio mix de PCR cuando corresponde.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific). A continuación, se muestran los volúmenes para cada reacción, así como el perfil de amplificación para cada kit.

3.3.1. GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific).

Tabla 3.1. Volúmenes por muestra de los componentes para la reacción de amplificación del Kit GlobalFiler IQC. Fuente: elaboración propia (2025).

Reactivo		Volumen
Master Mix		7,5 µL
Primer Mix		2,5 µL
Muestra	ADN	1 µL
	Inhibidor	1 µL
	H ₂ O Pura	13 µL
TOTAL		25 µL

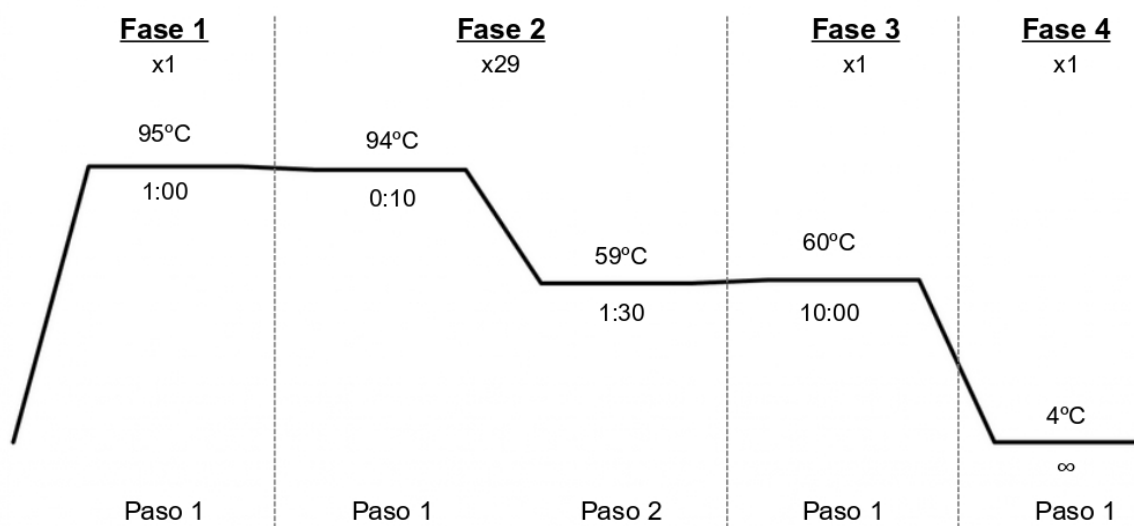


Figura 3.1. Condiciones de termociclado para el Kit Global Filer IQC. Fuente: elaboración propia (2025).

3.3.2. YFiler™ Plus PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific).

Tabla 3.2. Volúmenes por muestra de los componentes para la reacción de amplificación del Kit Y Filer.
Fuente: elaboración propia (2025).

Reactivo		Volumen
Master Mix		10 µL
Primer Mix		5 µL
Muestra	ADN	1 µL
	Inhibidor	1 µL
	H ₂ O Pura	8 µL
TOTAL		25 µL

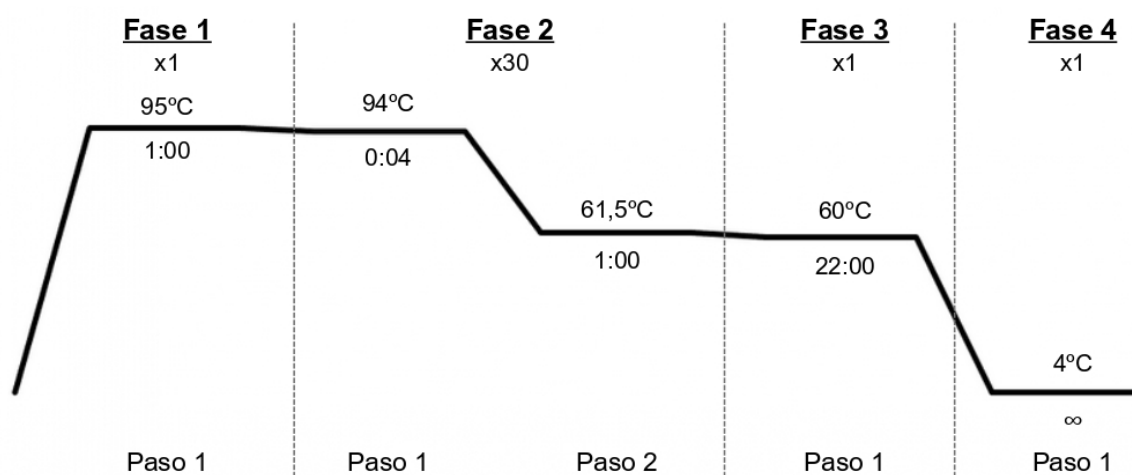


Figura 3.2. Condiciones de termociclado para el Kit Y Filer Plus. Fuente: elaboración propia (2025).

3.3.3. PowerPlex® Fusion 6C System (Promega).

Tabla 3.3. Volúmenes por muestra de los componentes para la reacción de amplificación del Kit PowerPlex Fusion. Fuente: elaboración propia (2025).

Reactivo		Volumen
Master Mix		5 µL
Primer Mix		5 µL
Muestra	ADN	1 µL
	Inhibidor	1 µL
	H ₂ O Pura	13 µL
TOTAL		25 µL

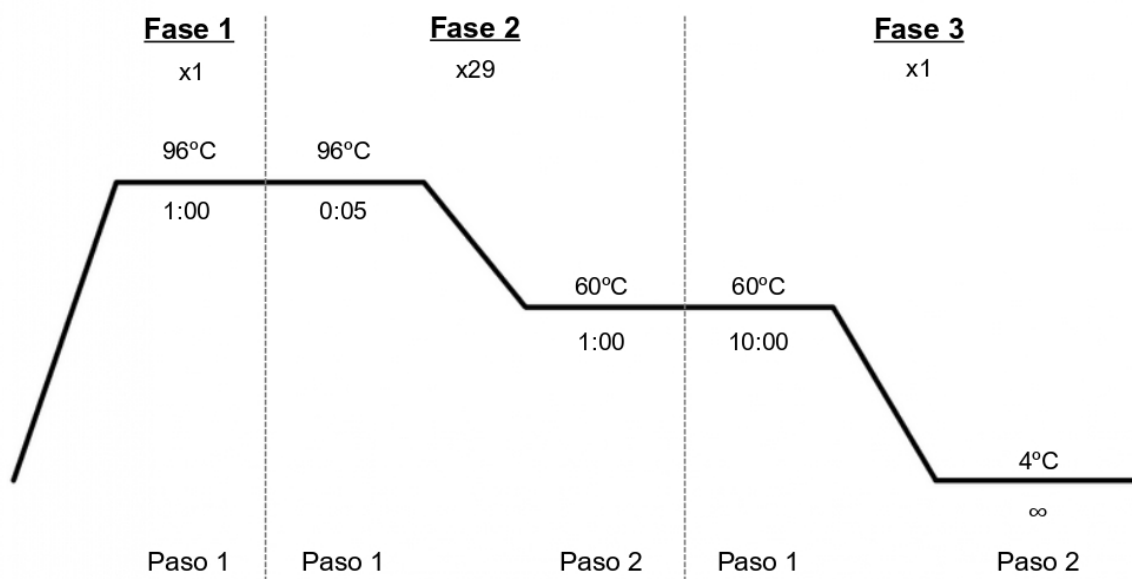


Figura 3.3. Condiciones de termociclado para el Kit PowerPlex Fusion 6C. Fuente: elaboración propia (2025).

3.3.4. PowerPlex® Y23 System (Promega).

Tabla 3.4. Volúmenes por muestra de los componentes para la reacción de amplificación del Kit Power Plex Y23. Fuente: elaboración propia (2025).

Reactivo		Volumen
Master Mix		5 µL
Primer Mix		2,5 µL
Muestra	ADN	1 µL
	Inhibidor	1 µL
	H ₂ O Pura	15,5 µL
TOTAL		25 µL

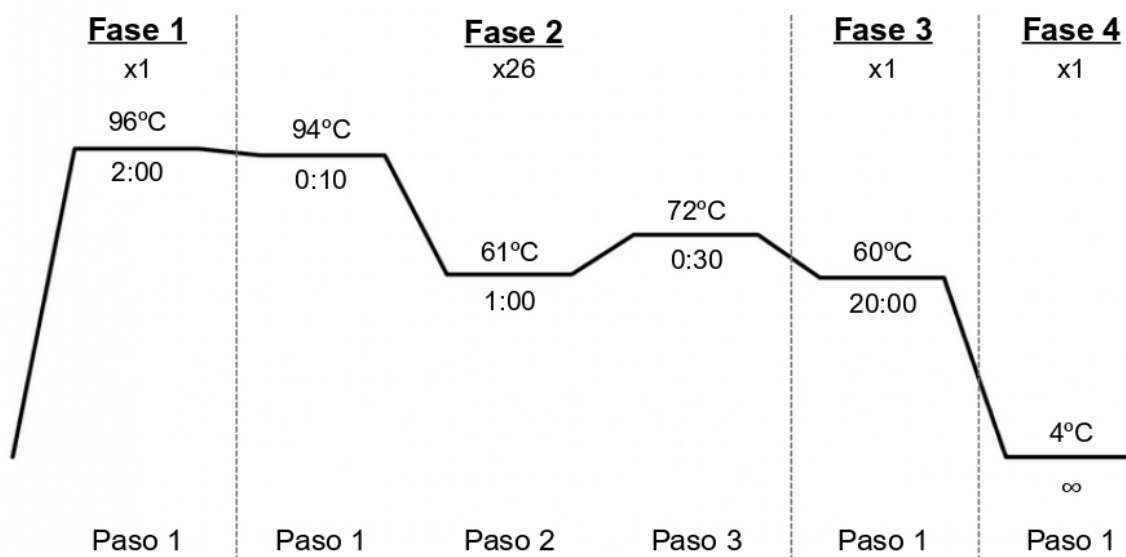


Figura 3.4. Condiciones de termociclado para el Kit PowerPlex Y23. Fuente: elaboración propia (2025).

3.3.5. Kit Investigator Argus X-12 QS (Investigator, QIAGEN).

Tabla 3.5. Volúmenes por muestra de los componentes para la reacción de amplificación del Kit Investigator Argus X-12 QS. Fuente: elaboración propia (2025).

Reactivo		Volumen
Fast Reaction Mix		7,5 µL
Primer Mix		2,5 µL
Muestra	ADN	1 µL
	Inhibidor	1 µL
	H ₂ O Pura	13 µL
TOTAL		25 µL

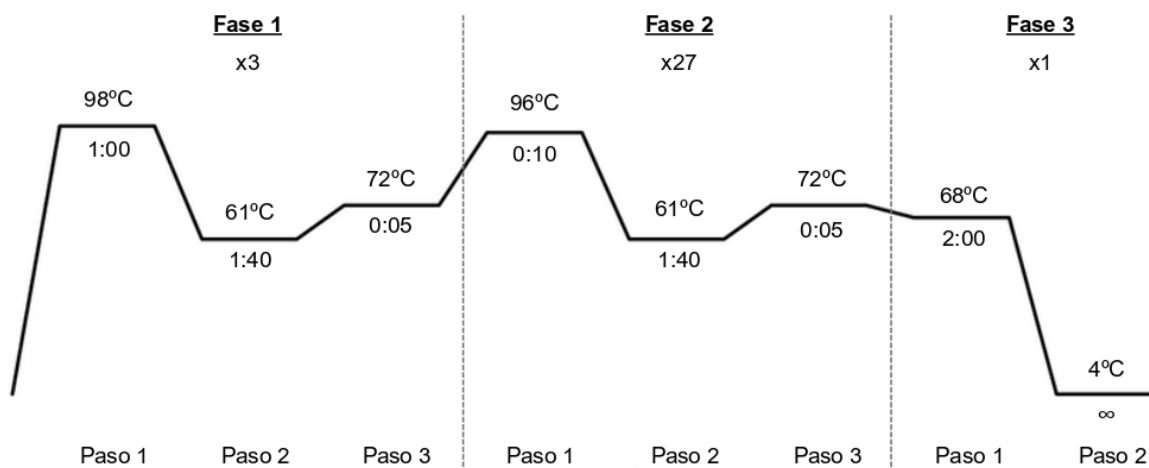


Figura 3.5. Condiciones de termociclado para el Kit Argus X12. Fuente: elaboración propia (2025).

3.4. Análisis de fragmentos del ADN.

El análisis de fragmentos STR amplificados se llevó a cabo mediante electroforesis capilar (EC) en el secuenciador 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific).

La preparación de las muestras para la EC se realizó mezclando 1 μ L de producto de PCR con 10 μ L de formamida (FMD) y 0,5 μ L del estándar de tamaño específico para cada kit:

- Para los kits GlobalFiler IQC e Yfiler Plus (ThermoFisher Scientific), se empleó el estándar LIZ600.
- Para los kits PowerPlex Fusion 6C y PowerPlex Y23 (Promega), se usó el estándar WEN.
- Para el kit Investigator Argus X-12 (QIAGEN) se utilizó el marcador BTO.

Además, aproximadamente cada 15 muestras se incluyó una escalera alélica, necesaria para calibrar correctamente los tamaños de los fragmentos en relación con el estándar interno, además de los controles positivos y negativos correspondientes de cada amplificación, los cuales son procesados como el resto de las muestras.

Una vez preparadas las mezclas, las placas se sometieron a un paso de desnaturalización térmica a 94°C durante 7 minutos en termociclador, para asegurar la correcta separación entre las hebras de ADN y permitir la hibridación precisa del ADN con la formamida y el estándar de tamaño. Tras este paso, las placas se introdujeron en el analizador genético para llevar a cabo la EC.

3.5. Análisis de perfiles genéticos.

Los electroferogramas obtenidos del Analizador Genético 3500 se observaron directamente en el software 3500 Data Collection para una primera inspección, pero después se exportaron al programa GeneMapper™ ID-X Software v1.4 (ThermoFisher Scientific) el cual permite realizar un análisis más detallado. Antes de la interpretación de los perfiles se aplicaron los siguientes parámetros, previamente establecidos y validados por el laboratorio, para un análisis más preciso de los resultados.

Para el Método de Análisis se emplean los RFU como método para establecer el umbral estocástico (UE) y el umbral analítico (UA), indicados en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Umbrales por kit y tipo de muestra para el Método de Análisis en GeneMapper. Fuente: elaboración propia (2025).

Kit	Muestra	UE (rfu)	UA (rfu)	PHR (%)
GlobalFiler IQC	MR	360	177	70
	RO	360	50	58
YFiler Plus	MR	340	150	70
	RO	340	70	50
PowerPlex Fusion 6C	MR	166	120	77
	RO	166	60	77
PowerPlex Y23	MR	370	100	80
	RO	370	70	60
Argus X12 QS	MR	485	154	88
	RO	485	62	69

El software también requiere la asignación de un Panel específico y Estándar de tamaño para cada muestra, estos parámetros se especifican en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Parámetros de Panel y Size Standard empleados en cada kit para el análisis con GeneMapper. Fuente: elaboración propia (2025).

Kit	Panel	Size Standard
GlobalFiler IQC	GlobalFiler-IQC_Panel_v4	GS600_LIZ_(60-460)
YFiler Plus	Yfiler_Plus_Panel_v4.1X	GS600_LIZ_(60-460)
PowerPlex Fusion 6C	Powerplex_Fusion_6C	Wen_65-500
PowerPlex Y23	PowerPlexY23_IDX_v.2.0	Wen_65-500
Argus X12 QS	Argus_X12_QS_Panels_v4	BTO_450

3.6. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software estadístico de código y acceso abierto Jamovi v2.6.44.

3.6.1. *Reproducibilidad de los alelos.*

Para evaluar la reproducibilidad se compararon los perfiles genéticos obtenidos en las muestras sin inhibidor con aquellos generados en presencia de los distintos inhibidores. Se analizó si los alelos obtenidos coincidían en ambos casos, observando su concordancia en los electroferogramas y asignando en porcentajes la coincidencia total de alelos en cada kit.

3.6.2. *Alturas de los alelos.*

Para valorar como pueden afectar los inhibidores a las alturas de los picos se realizaron análisis descriptivos básicos que permiten la comparación de medias, promedios, mínimos, máximos, y la desviación estándar.

Además, se hace un Análisis de la varianza (ANOVA) y sus correspondientes pruebas Post Hoc cuando hay significancia, incluyendo las pruebas sin correcciones, la Prueba T, Prueba de Tukey y la Prueba de Bonferroni.

3.6.3. *Peak Height Ratios (PHR).*

Para cada locus heterocigoto el PHR se calcula dividiendo la altura del pico con menor RFU entre el pico con mayor RFU y multiplicando el resultado por 100.

Para determinar si hay diferencias significativas entre los distintos PHRs obtenidos también se realizan unos análisis descriptivos básicos como los descritos para las alturas y, de la misma manera, cuando sea oportuno se realiza un ANOVA y las respectivas pruebas Post-Hoc.

4. RESULTADOS.

4.1. Reproducibilidad de los alelos.

4.1.1. Reproducibilidad Kit GlobalFiler IQC.

En este kit se obtuvo una reproducibilidad del 100% para ambas muestras, obteniendo los mismos perfiles con todos los inhibidores usados en dichas concentraciones excepto para la amplificación realizada con los beads, para la cual no se ha obtenido ninguna información genética porque se ha producido una inhibición completa, y por tanto se ha excluido en el cálculo del porcentaje de reproducibilidad (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Reproducibilidad de los alelos con GlobalFiler IQC. Los números denotan el alelo concreto, definido por el número de repeticiones del microsatélite. Fuente: elaboración propia (2025).

M5 GlobalFiler IQC	M5 Sin inhibición		M5 HA C1		M5 HA C2		M5 AcHu C1		M5 AcHu C2		M5 Etanol		M5 Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Marcador														
IQCS	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
D3S1358	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15		
vWA	14	18	14	18	14	18	14	18	14	18	14	18		
D16S539	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11		
CSF1PO	9	12	9	12	9	12	9	12	9	12	9	12		
TPOX	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
IQCL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Yindel	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
D8S1179	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14		
D21S11	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2		
D18S51	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14		
DYS391	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
D2S441	11	11,3	11	11,3	11	11,3	11	11,3	11	11,3	11	11,3		
D19S433	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
TH01	8	9,3	8	9,3	8	9,3	8	9,3	8	9,3	8	9,3		
FGA	19	21	19	21	19	21	19	21	19	21	19	21		
D22S1045	11	16	11	16	11	16	11	16	11	16	11	16		
D5S818	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12		
D13S317	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12		
D7S820	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
SE33	22	28,2	22	28,2	22	28,2	22	28,2	22	28,2	22	28,2		
D10S1248	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14		
D1S1656	12	15	12	15	12	15	12	15	12	15	12	15		
D12S391	20	22	20	22	20	22	20	22	20	22	20	22		
D2S1338	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17		

RO GlobalFiler IQC	RO Sin inhibición		RO HA C1		RO HA C2		RO AcHu C1		RO AcHu C2		RO Etanol		RO Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Marcador														
IQCS	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
D3S1358	17	18	17	18	17	18	17	18	17	18	17	18		
vWA	15	18	15	18	15	18	15	18	15	18	15	18		
D16S539	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11		
CSF1PO	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13		
TPOX	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
IQCL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
Yindel	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
D8S1179	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
D21S11	29	31	29	31	29	31	29	31	29	31	29	31		
D18S51	16	19	16	19	16	19	16	19	16	19	16	19		
DYS391	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
D2S441	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
D19S433	14	14,2	14	14,2	14	14,2	14	14,2	14	14,2	14	14,2		
TH01	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9		
FGA	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21		
D22S1045	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16		
D5S818	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
D13S317	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
D7S820	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11		
SE33	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2		
D10S1248	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16		
D1S1656	16,3	17	16,3	17	16,3	17	16,3	17	16,3	17	16,3	17		
D12S391	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19		
D2S1338	17	25	17	25	17	25	17	25	17	25	17	25		

Mismo alelo	Alelo distinto	Dropout	Ausencia de información genética
-------------	----------------	---------	----------------------------------

4.1.2. Reproducibilidad Kit YFiler Plus.

Para YFiler Plus la reproducibilidad es también del 100% para ambas muestras con todos los inhibidores excepto para los beads, donde también se observa una inhibición completa y se vuelve a excluir en el cálculo del porcentaje (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Reproducibilidad de los alelos con YFiler Plus. Los números denotan el alelo concreto, definido por el número de repeticiones del microsatélite. Fuente: elaboración propia (2025).

M5 YFiler Plus	M5 Sin inhibición		M5 HA C1		M5 HA C2		M5 AcHu C1		M5 AcHu C2		M5 Etanol		M5 Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
DYS576	17		17		17		17		17		17			
DYS389I	12		12		12		12		12		12			
DYS635	23		23		23		23		23		23			
DYS389II	28		28		28		28		28		28			
DYS627	21		21		21		21		21		21			
DYS460	11		11		11		11		11		11			
DYS458	17		17		17		17		17		17			
DYS19	14		14		14		14		14		14			
YGATAH4	12		12		12		12		12		12			
DYS448	19		19		19		19		19		19			
DYS391	11		11		11		11		11		11			
DYS456	17		17		17		17		17		17			
DYS390	23		23		23		23		23		23			
DYS438	12		12		12		12		12		12			
DYS392	13		13		13		13		13		13			
DYS518	36		36		36		36		36		36			
DYS570	17		17		17		17		17		17			
DYS437	15		15		15		15		15		15			
DYS385	11	13	11	13	11	13	11	13	11	13	11	13		
DYS449	28		28		28		28		28		28			
DYS393	13		13		13		13		13		13			
DYS439	12		12		12		12		12		12			
DYS481	22		22		22		22		22		22			
DYF387S1	35		35		35		35		35		35			
DYS533	12		12		12		12		12		12			

RO YFiler Plus	RO Sin inhibición		RO HA C1		RO HA C2		RO AcHu C1		RO AcHu C2		RO Etanol		RO Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
DYS576	19		19		19		19		19		19			
DYS389I	13		13		13		13		13		13			
DYS635	23		23		23		23		23		23			
DYS389II	29		29		29		29		29		29			
DYS627	23		23		23		23		23		23			
DYS460	11		11		11		11		11		11			
DYS458	17		17		17		17		17		17			
DYS19	14		14		14		14		14		14			
YGATAH4	13		13		13		13		13		13			
DYS448	19		19		19		19		19		19			
DYS391	11		11		11		11		11		11			
DYS456	14		14		14		14		14		14			
DYS390	24		24		24		24		24		24			
DYS438	12		12		12		12		12		12			
DYS392	13		13		13		13		13		13			
DYS518	39		39		39		39		39		39			
DYS570	17		17		17		17		17		17			
DYS437	15		15		15		15		15		15			
DYS385	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14		
DYS449	29		29		29		29		29		29			
DYS393	13		13		13		13		13		13			
DYS439	12		12		12		12		12		12			
DYS481	22		22		22		22		22		22			
DYF387S1	35		35		35		35		35		35			
DYS533	12		12		12		12		12		12			

Mismo alelo	Alelo distinto	Dropout	Ausencia de información genética
-------------	----------------	---------	----------------------------------

4.1.3. Reproducibilidad Kit PowerPlex Fusion 6C.

Para PowerPlex Fusion 6C la reproducibilidad es del 100% para ambas muestras excepto para la amplificación realizada con los beads, los cuales producen una inhibición completa, faltando información en todos los marcadores y excluyendo estos resultados del cálculo del porcentaje de reproducibilidad (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Reproducibilidad de los alelos con PowerPlex Fusion 6C. Los números denotan el alelo concreto, definido por el número de repeticiones del microsátélite. Fuente: elaboración propia (2025).

M5 PowerPlex Fusion 6C	M5 Sin inhibición		M5 HA C1		M5 HA C2		M5 AcHu C1		M5 AcHu C2		M5 Etanol		M5 Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Marcador	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
D3S1358	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15		
D1S1656	12	15	12	15	12	15	12	15	12	15	12	15		
D2S441	11	11,3	11	11,3	11	11,3	11	11,3	11	11,3	11	11,3		
D10S1248	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14		
D13S317	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12		
Penta E	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12		
D16S539	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11		
D18S51	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14		
D2S1338	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17		
CSF1PO	9	12	9	12	9	12	9	12	9	12	9	12		
Penta D	9	10	9	10	9	10	9	10	9	10	9	10		
TH01	8	9,3	8	9,3	8	9,3	8	9,3	8	9,3	8	9,3		
vWA	14	18	14	18	14	18	14	18	14	18	14	18		
D21S11	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2		
D7S820	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
D5S818	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12		
TPOX	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		
D8S1179	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14	12	14		
D12S391	20	22	20	22	20	22	20	22	20	22	20	22		
D19S433	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
SE33	22	28,2	22	28,2	22	28,2	22	28,2	22	28,2	22	28,2		
D22S1045	11	16	11	16	11	16	11	16	11	16	11	16		
DYS391	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
FGA	19	21	19	21	19	21	19	21	19	21	19	21		
DYS576	17		17		17		17		17		17			
DYS570	17		17		17		17		17		17			

RO PowerPlex Fusion 6C	RO Sin inhibición		RO HA C1		RO HA C2		RO AcHu C1		RO AcHu C2		RO Etanol		RO Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Marcador	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
D3S1358	17	18	17	18	17	18	17	18	17	18	17	18		
D1S1656	16,3	17	16,3	17	16,3	17	16,3	17	16,3	17	16,3	17		
D2S441	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
D10S1248	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16		
D13S317	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
Penta E	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
D16S539	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11		
D18S51	16	19	16	19	16	19	16	19	16	19	16	19		
D2S1338	17	25	17	25	17	25	17	25	17	25	17	25		
CSF1PO	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13		
Penta D	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		
TH01	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9	6	9		
vWA	15	18	15	18	15	18	15	18	15	18	15	18		
D21S11	29	31	29	31	29	31	29	31	29	31	29	31		
D7S820	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11		
D5S818	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
TPOX	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11	10	11		
D8S1179	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
D12S391	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19		
D19S433	14	14,2	14	14,2	14	14,2	14	14,2	14	14,2	14	14,2		
SE33	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2	27,2	29,2		
D22S1045	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16	15	16		
DYS391	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11		
FGA	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21		
DYS576	19		19		19		19		19		19			
DYS570	17		17		17		17		17		17			

Mismo alelo	Alelo distinto	Dropout	Ausencia de información genética
-------------	----------------	---------	----------------------------------

4.1.4. Reproducibilidad Kit PowerPlex Y23.

Para PowerPlex Y23 la reproducibilidad en la muestra M5 es del 95,45% ya que se observa dropout en el caso de algunos alelos situados sobre todo en los marcadores de mayor tamaño. Para la muestra de RO la reproducibilidad disminuye a un 81,06% al verse afectada por la degradación, perdiendo alelos en todos los marcadores de mayor tamaño, además donde más se observan los efectos de inhibición es en la amplificación con etanol en la muestra de RO, donde la pérdida de información genética es bastante significativa. Como para el resto de los kits, observamos una pérdida completa de la información genética en las amplificaciones con beads y por tanto se excluye también del cálculo del porcentaje (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Reproducibilidad de los alelos con PowerPlex Y23. Los números denotan el alelo concreto, definido por el número de repeticiones del microsatélite. Fuente: elaboración propia (2025).

M5 PowerPlex Y23	M5 Sin inhibición		M5 HA C1		M5 HA C2		M5 AcHu C1		M5 AcHu C2		M5 Etanol		M5 Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Marcador														
DYS576	17		17		17		17		17		17			
DYS389 I	12		12		12		12		12		12			
DYS448	19		19		19		19		19		19			
DYS389 II	28		28								28			
DYS19	14		14						14		14			
DYS391	11		11		11		11		11		11			
DYS481	22		22		22		22		22		22			
DYS549	12		12		12		12		12		12			
DYS533	12		12		12		12		12		12			
DYS438	12		12				12		12		12			
DYS437	15		15		15		15		15		15			
DYS570	17		17		17		17		17		17			
DYS635	23		23		23		23		23		23			
DYS390	23		23		23		23		23		23			
DYS439	12		12		12		12		12		12			
DYS392	13		13		13		13		13		13			
DYS643	10		10		10		10		10		10			
DYS393	13		13		13		13		13		13			
DYS458	17		17		17		17		17		17			
DYS385	11	13	11	13	11	13	11	13	11	13	11	13		
DYS456	17		17		17		17		17		17			
YGATAH4	12		12		12		12		12		12			

RO PowerPlex Y23	RO Sin inhibición		RO HA C1		RO HA C2		RO AcHu C1		RO AcHu C2		RO Etanol		RO Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Marcador														
DYS576	19		19		19		19		19		19			
DYS389 I	13		13		13		13		13		13			
DYS448	19		19		19		19		19		19			
DYS389 II	29		29		29				29		29			
DYS19					14 (91)									
DYS391	11		11		11		11		11		11			
DYS481	22		22		22		22		22		22			
DYS549	12		12		12		12		12		12			
DYS533	12		12		12		12		12		12			
DYS438	12		12		12				12		12			
DYS437					15 (78)									
DYS570	17		17		17		17		17		17			
DYS635	23		23		23		23		23		23			
DYS390	24		24		24		24		24		24			
DYS439	12		12		12		12		12		12			
DYS392	13		13		13				13		13			
DYS643														
DYS393	13		13		13		13		13		13			
DYS458	17		17		17		17		17		17			
DYS385	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14		
DYS456	14		14		14		14		14		14			
YGATAH4	13		13		13				13		13			

Mismo alelo	Alelo distinto	Dropout	Ausencia de información genética	Información genética obtenida con UA bajo (UA: 70 rfo)
-------------	----------------	---------	----------------------------------	--

4.1.5. Reproducibilidad Kit Investigator Argus X-12 QS.

En Argus X12 se obtuvo una reproducibilidad del 93,33% en el caso de la muestra M5 y de un 95,56% para la muestra de RO (Tabla 4.5). El etanol ha sido el inhibidor que mayor impacto tuvo sobre la reproducibilidad, provocando inhibición parcial que afectó a la lectura de la polimerasa, manifestándose como dropouts alélicos, errores en la asignación de alelos y OLs (Off Ladder).

En el perfil de M5 con etanol se observan 6 alelos asignados incorrectamente: 4 OLs y 2 se perdieron, todos en el DYE amarillo en los marcadores de mayor tamaño. Mientras que en el perfil de RO con etanol se han identificado 5 alelos mal asignados: 2 OLs, 2 alelos asignados erróneamente y dados por válidos, y 1 dropout.

Para los beads magnéticos también se observa una pérdida total de la información genética obtenida en ambas muestras, así que igualmente se ha excluido del cálculo del porcentaje de reproducibilidad.

Para mayor detalle en los perfiles de M5 y RO obtenidos con el etanol referir a los electroferogramas correspondientes en el Apéndice 2 y el Apéndice 3.

Tabla 4.5. Reproducibilidad de los alelos con Argus X-12. Los números denotan el alelo concreto, definido por el número de repeticiones del microsatélite. Fuente: elaboración propia (2025).

M5 Argus X-12	M5 Sin inhibición		M5 HA C1		M5 HA C2		M5 AcHu C1		M5 AcHu C2		M5 Etanol		M5 Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
QS1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
AM	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
DXS10103	16		16		16		16		16		16/OL	16/OL		
DXS8378	11		11		11		11		11		11/OL	11/OL		
DXS10101	31		31		31		31		31			31		
DXS10134	33		33		33		33		33		33/OL	33/OL		
DXS10074	17		17		17		17		17			17		
DXS7132	14		14		14		14		14			14		
DXS10135	29		29		29		29		29			29		
DXS7423	17		17		17		17		17			17		
DXS10146	26		26		26		26		26					
DXS10079	22		22		22		22		22					
HPRTB	14		14		14		14		14			14		
DXS10148	18		18		18		18		18		18/OL	18/OL		
D21S11	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2	29	32,2		

ROArgus X-12	RO Sin inhibición		RO HA C1		RO HA C2		RO AcHu C1		RO AcHu C2		RO Etanol		RO Beads	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
QS1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
AM	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
DXS10103	20		20		20		20		20		20/OL	20/OL		
DXS8378	11		11		11		11		11		11/OL	11/OL		
DXS10101	31,2		31,2		31,2		31,2		31,2			31,2		
DXS10134	36		36		36		36		36		35,3	36		
DXS10074	16		16		16		16		16			16		
DXS7132	12		12		12		12		12			12		
DXS10135	20		20		20		20		20			20		
DXS7423	15		15		15		15		15			15		
DXS10146	29		29		29		29		29			29		
DXS10079	17		17		17		17		17					
HPRTB	14		14		14		14		14			14		
DXS10148	27,1		27,1		27,1		27,1		27,1		27	27,1		
D21S11	29	31	29	31	29	31	29	31	29	31	29	31		

Mismo alelo	Alelo distinto	Dropout	Ausencia de información genética
-------------	----------------	---------	----------------------------------

4.2. Altura de los alelos.

4.2.1. Alturas Kit GlobalFiler IQC.

Tabla 4.6. Alturas de los alelos de M5 con el Kit Global Filer IQC. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	52	3742	2149
M5 AcHu C1	52	2478	1459
M5 AcHu C2	52	2136	970
M5 HA C1	52	2844	1407
M5 HA C2	52	2489	1245
M5 Etanol	52	3235	1591

Tabla 4.7. Alturas de los alelos de RO con el Kit Global Filer IQC. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibor	52	7843	7789
RO AcHu C1	52	7069	7139
RO AcHu C2	52	6135	6212
RO HA C1	52	5423	5344
RO HA C2	52	5979	5925
RO Etanol	52	6583	6615

4.2.2. Alturas Kit YFiler Plus.

Tabla 4.8. Alturas de los alelos de M5 con el Kit YFiler Plus. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	50	9545	3370
M5 AcHu C1	50	882	310
M5 AcHu C2	50	1651	492
M5 HA C1	50	1745	610
M5 HA C2	50	2620	679
M5 Etanol	50	2338	1176

Tabla 4.9. Alturas de los alelos de RO con el Kit YFiler Plus. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibidor	52	10453	8174
RO AcHu C1	52	4053	3542
RO AcHu C2	52	4482	3964
RO HA C1	52	5714	5066
RO HA C2	52	4043	3440
RO Etanol	52	2655	2392

4.2.3. Alturas Kit PowerPlex Fusion 6C.

Tabla 4.10. Alturas de los alelos de M5 con el Kit PowerPlex Fusion 6C. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	52	1656	455
M5 AcHu C1	52	1556	507
M5 AcHu C2	52	1527	435
M5 HA C1	52	1815	622
M5 HA C2	52	1806	509
M5 Etanol	52	1765	642

Tabla 4.11. Alturas de los alelos de RO con el Kit PowerPlex Fusion 6C. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibidor	52	6006	7085
RO AcHu C1	52	7026	8142
RO AcHu C2	52	5933	6914
RO HA C1	52	3794	4394
RO HA C2	52	4448	5190
RO Etanol	52	4111	4333

4.2.4. Alturas Kit PowerPlex Y23.

Tabla 4.12. Alturas de los alelos de M5 con el Kit PowerPlex Y23. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	44	333	126
M5 AcHu C1	40	224	87
M5 AcHu C2	42	213	95,1
M5 HA C1	44	398	134
M5 HA C2	38	231	82,1
M5 Etanol	44	391	256

Tabla 4.13. Alturas de los alelos de RO con el Kit PowerPlex Y23. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibidor	38	758	707
RO AcHu C1	30	702	565
RO AcHu C2	38	760	681
RO HA C1	38	749	666
RO HA C2	42	768	753
RO Etanol	28	879	704

4.2.5. Alturas Kit Investigator Argus X-12 QS.

Tabla 4.14. Alturas de los alelos de M5 con el Kit Investigator Argus X-12 QS. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	30	6752	2172
M5 AcHu C1	30	4399	1388
M5 AcHu C2	30	5208	1737
M5 HA C1	30	4181	1377
M5 HA C2	30	4490	1215
M5 Etanol	26	2122	1268

Tabla 4.15. Alturas de los alelos de RO con el Kit Investigator Argus X-12 QS. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibidor	30	9300	6024
RO AcHu C1	30	5987	4467
RO AcHu C2	30	7832	5440
RO HA C1	30	8796	6170
RO HA C2	30	5372	3973
RO Etanol	28	3505	4439

4.3. Peak Height Ratios (PHR).

4.3.1. PHR Kit GlobalFiler IQC.

Tabla 4.16. PHR Alelos heterocigotos de M5 con el Kit GlobalFiler IQC. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	19	87,9	9,63
M5 AcHu C1	19	85,3	9,67
M5 AcHu C2	19	84,7	10,5
M5 HA C1	19	89,4	7,50
M5 HA C2	19	81,7	8,77
M5 Etanol	19	85,2	10,2

Tabla 4.17. PHR Alelos heterocigotos de RO con el Kit GlobalFiler IQC. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibidor	17	85,3	14,7
RO AcHu C1	17	83,6	13,9
RO AcHu C2	17	80,5	15,9
RO HA C1	17	81,3	17,3
RO HA C2	17	83,0	10,4
RO Etanol	17	83,2	11,9

4.3.2. PHR Kit YFiler Plus.

Los valores de PHR obtenidos para el único marcador bialélico, en la muestra M5 varían desde un 84 hasta un 94,8, mientras que en la muestra de RO hay valores de PHR desde un 76,3 hasta un 86,2.

4.3.3. PHR Kit PowerPlex Fusion 6C.

Tabla 4.18. PHR Alelos heterocigotos de M5 con el Kit PowerPlex Fusion 6C. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
M5 Sin Inhibidor	21	85,3	11,1
M5 AcHu C1	21	84,3	9,10
M5 AcHu C2	21	85,5	8,35
M5 HA C1	21	85,0	10,0
M5 HA C2	21	88,9	10,6
M5 Etanol	21	85,3	8,77

Tabla 4.19. PHR Alelos heterocigotos de RO con el Kit PowerPlex Fusion 6C. Fuente: elaboración propia (2025).

Muestra	N	Media	Desviación Estándar
RO Sin Inhibidor	17	85,4	10,9
RO AcHu C1	18	82,8	12,1
RO AcHu C2	18	80,5	13,1
RO HA C1	18	85,9	9,55
RO HA C2	18	86,4	11,0
RO Etanol	18	87,8	9,96

4.3.4. PHR Kit PowerPlex Y23.

Con PowerPlex Y23 se han obtenido valores de PHR para los marcadores bialélicos desde un 67,3 a un 99,2 en el caso de las muestras de M5, y desde un 81,3 hasta un 99,3 en las muestras de RO.

4.3.5. *PHR Kit Investigator Argus X-12 QS.*

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de inhibidores, especialmente el etanol, ha afectado gravemente a la asignación de los alelos con este kit. Debido a esta asignación errónea no se pueden hacer cálculos exactos de los valores de PHR incluyendo estos alelos heterocigotos pues es un error en la lectura y se comprometería la fiabilidad de estos resultados. Teniendo en cuenta solo los valores obtenidos por los marcadores bialélicos reales se han obtenido unos resultados de PHRs de entre 71 y 98 para la muestra M5, y entre 49 y 96 para la muestra de RO.

5. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran como la presencia de inhibidores durante el proceso de amplificación puede afectar significativamente la calidad y fiabilidad de los perfiles genéticos resultantes. La influencia de estos inhibidores se manifestó de forma variable dependiendo tanto del tipo de compuesto inhibidor como del kit de PCR utilizado.

Los agentes inhibidores más perjudiciales fueron claramente el etanol y los beads magnéticos, que provocaron fenómenos como dropouts alélicos, Off-Ladders (OLs) y, en algunos casos, inhibición completa de la amplificación, como se observó especialmente en el kit Argus X-12 QS y en PowerPlex Y23. Estos efectos fueron más marcados en las muestras de RO, resaltando la mayor vulnerabilidad del ADN degradado frente a inhibidores persistentes.

En cambio, los inhibidores naturalmente presentes en las muestras, como la hidroxiapatita (HA) y el ácido húmico (AcHu), mostraron efectos más moderados, aunque no despreciables. En particular, se observó un aumento de la desviación estándar en las alturas de los alelos, así como alteraciones en los valores de PHR en loci de mayor tamaño, lo que puede afectar la interpretación de perfiles heterocigotos. Este incremento de la desviación estándar se traduce en una mayor dispersión y variabilidad en los resultados obtenidos, mostrando mayores afectaciones en las muestras de RO con inhibidores, aunque sin comprometer por completo la reproducibilidad de los alelos.

Los efectos observados coinciden con lo reportado en investigaciones previas sobre los efectos de los inhibidores en muestras forenses. Diversos estudios como los de Schrader et al., 2012a y Alaeddini, 2012 ya habían documentado la capacidad de inhibición del AcHu y el etanol en la PCR, atribuyéndola a la interferencia directa con la ADN polimerasa o con el ADN molde.

En el caso de la HA, artículos previos han descrito su doble papel como agente protector y como barrera química para la polimerasa, reforzando los resultados obtenidos en este estudio (Okazaki et al., 2001). En cuanto a los beads magnéticos, aunque son herramientas útiles para la purificación, pueden ser perjudiciales si quedan residuos tras su uso durante procesos de extracción, como se ha observado en este trabajo. En el estudio de Maher et al., 2001 también se destacó esta doble cara de los beads, lo que refuerza la importancia de garantizar su retirada al terminar los protocolos de extracción.

En cuanto al comportamiento de los distintos kits, GlobalFiler IQC, YFiler Plus y PowerPlex Fusion 6C demostraron una mayor estabilidad y reproducibilidad, alcanzando un 100% de coincidencia alélica en la mayoría de las condiciones, salvo con beads magnéticos. Estos kits demostraron una mayor tolerancia a la inhibición, lo que hace que sean las herramientas más adecuadas para contextos donde se espera encontrar ADN degradado o inhibidores persistentes.

Un comportamiento particular se observó en el kit Argus X-12 QS, donde las alturas de los alelos en la muestra RO fueron inusualmente elevadas en comparación con la muestra M5. Esto puede deberse a la mayor cantidad de ADN empleada para la amplificación con el fin de compensar la degradación, o al efecto estocástico dado en el pipeteo durante el experimento, dando lugar a señales más intensas, pero con una mayor desviación estándar y consecuente variabilidad de los resultados. (Timken et al., 2014). Además, este kit mostró una sensibilidad considerable al etanol, presentando múltiples errores de lectura y una menor reproducibilidad.

Por último, en cuanto a la elección de kits, el buen rendimiento de GlobalFiler IQC y de YFiler Plus coinciden con los informes de validación existentes (Gopinath et al.,

2016; Ludeman et al., 2018), que destacan su sensibilidad, estabilidad y capacidad para ofrecer perfiles fiables incluso en condiciones desfavorables. Por ello, estos kits destacan como candidatos óptimos para su uso rutinario en laboratorios forenses dedicados a la identificación genética en contextos históricos.

6. CONCLUSIONES.

A razón del propósito del trabajo y según los resultados obtenidos se puede concluir:

1. Los beads magnéticos a la concentración estudiada fueron el inhibidor más perjudicial, produciendo una inhibición completa de la PCR en todos los kits, demostrando la importancia de la completa eliminación los beads en la purificación para evitar que residuos interfieran en la calidad y fiabilidad de los resultados.

2. El etanol fue el segundo inhibidor que más afectó a los resultados, causando graves fallos en la lectura de la polimerasa y produciendo dropouts, Off-Ladders y asignaciones alélicas erróneas, especialmente en kits como Argus X12 QS y PowerPlex Y23, y más marcadamente aún en las muestras degradadas.

3. El AcHu y la HA generaron efectos inhibidores leves, principalmente en las concentraciones altas, y con un impacto variable dependiendo del kit utilizado. El principal efecto observado fue una reducción en la altura de los picos, mientras que los valores de PHR no se vieron tan alterados. Su interferencia fue especialmente notoria en kits menos estables como PowerPlex Y23. Para una mejor evaluación de ambos inhibidores, convendría ampliar el rango de concentraciones empleadas en el estudio para poder describir con mayor precisión sus efectos.

4. Finalmente, en cuanto a la estabilidad de los kits frente a inhibidores, GlobalFiler IQC fue el más resistente, manteniendo una reproducibilidad del 100% y reportando información verídica y de calidad, salvo en presencia de los beads. Los kits YFiler Plus y PowerPlex Fusion 6C le siguen en estabilidad, ambos mostrando perfiles completos y estables en casi todas las condiciones. Argus X12 QS mostró especial sensibilidad al etanol, y PowerPlex Y23 resultó ser el kit más afectado por los inhibidores.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.006>
- Alaeddini, R., Walsh, S. J., & Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.09.007>
- Alvarez-Cubero, M. J., Saiz, M., Martínez-García, B., Sayalero, S. M., Entrala, C., Lorente, J. A., & Martínez-Gonzalez, L. J. (2017). Next generation sequencing: An application in forensic sciences? *Annals of Human Biology*, 44(7), 581-592. <https://doi.org/10.1080/03014460.2017.1375155>
- Alvarez-Cubero, M. J., Saiz, M., Martínez-Gonzalez, L. J., Alvarez, J. C., Eisenberg, A. J., Budowle, B., & Lorente, J. A. (2012). Genetic identification of missing persons: DNA analysis of human remains and compromised samples. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 79(5), 228-238. <https://doi.org/10.1159/000334982>
- Aly, S. M., & Sabri, D. M. (2015). Next generation sequencing (NGS): A golden tool in forensic toolkit. *Archiwum Medycyny Sadowej I Kryminologii*, 65(4), 260-271. <https://doi.org/10.5114/amsik.2015.61029>
- Ambers, A. (2023). Chapter 5—Skeletal microstructure, bone diagenesis, optimal sample selection, and pre-processing preparation techniques for DNA testing. En A. Ambers (Ed.), *Forensic Genetic Approaches for Identification of Human Skeletal Remains* (pp. 81-117). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815766-4.00005-4>
- Budowle, B., & van Daal, A. (2008). Forensically Relevant SNP Classes. *BioTechniques*, 44(5), 603-610. <https://doi.org/10.2144/000112806>
- Budowle, B., Bieber, F. R., & Eisenberg, A. J. (2005). Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification. *Legal Medicine*, 7(4), 230-243. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2005.01.001>
- Coble, M. D., & Butler, J. M. (2005). Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 50(1), 43-53.
- CODIS Archive. (s. f.). [Folder]. Law Enforcement. Recuperado 11 de mayo de 2025, de <https://le.fbi.gov/science-and-lab/biometrics-and-fingerprints/codis-2>

- Collins, M. J., Nielsen–Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., Wess, T. J., Csapò, J., Millard, A. R., & Turner–Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: A review. *Archaeometry*, *44*(3), 383-394. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.t01-1-00071>
- Cooley, A. M. (2023). Mitochondrial DNA Analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2685*, 331-349. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3295-6_20
- Cooper, A., & Poinar, H. N. (2000). Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, *289*(5482), 1139-1139. <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1139b>
- Cupples Connon, C. (Ed.). (2023). *Forensic DNA Analysis: Methods and Protocols* (Vol. 2685). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3295-6>
- Fernández, C. (s. f.). *Estudio de los microsatélites y miniSTRs del cromosoma X de aplicación forense*.
GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kit. (s. f.). Recuperado 3 de febrero de 2025, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/A43565>
- Gopinath, S., Zhong, C., Nguyen, V., Ge, J., Lagacé, R. E., Short, M. L., & Mulero, J. J. (2016). Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Science International. Genetics*, *24*, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.006>
- Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A. M., Crubézy, E., Ludes, B., & Drouet, C. (2014). Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Applied Surface Science*, *292*, 867-875. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.12.063>
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., & Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews. Genetics*, *2*(5), 353-359. <https://doi.org/10.1038/35072071>
- I-Familia*. (s. f.). Recuperado 11 de mayo de 2025, de <https://www.interpol.int/es/Como-trabajamos/Policia-cientifica/I-Familia>
- Jeffreys, A. J. (2005). Genetic fingerprinting. *Nature Medicine*, *11*(10), 1035-1039. <https://doi.org/10.1038/nm1005-1035>
- Kayser, M. (2017). Forensic use of Y-chromosome DNA: A general overview. *Human Genetics*, *136*(5), 621-635. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1776-9>

- Kit Investigator Argus X-12 QS*. (s. f.). Recuperado 8 de abril de 2025, de <https://www.qiagen.com/es/products/human-id-and-forensics/str-technology/investigator-argus-x-12-qs-kit>
- Lorente, J. A., Entrala, C., Alvarez, J. C., Lorente, M., Villanueva, E., Carrasco, F., & Budowle, B. (2000). Missing persons identification: Genetics at work for society. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5500), 2257-2258. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2257c>
- Ludeman, M. J., Zhong, C., Mulero, J. J., Lagacé, R. E., Hennessy, L. K., Short, M. L., & 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>
- Maher, N., Dillon, H. K., Vermund, S. H., & Unnasch, T. R. (2001). Magnetic Bead Capture Eliminates PCR Inhibitors in Samples Collected from the Airborne Environment, Permitting Detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(1), 449-452. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.449-452.2001>
- NIST STRBase*. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2025, de <https://strbase.nist.gov/Kits/AllKits>
- Okazaki, M., Yoshida, Y., Yamaguchi, S., Kaneno, M., & Elliott, J. C. (2001). Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials*, *22*(18), 2459-2464. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00433-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00433-6)
- Pääbo, S., Irwin, D. M., & Wilson, A. C. (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(8), 4718-4721.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., & 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>
- Paget, E., Monrozier, L. J., & Simonet, P. (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: Protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiology Letters*, *97*(1-2), 31-39. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05435.x>

- PowerPlex® Fusion 6C System*. (s. f.). Recuperado 3 de febrero de 2025, de <https://www.promega.es/products/forensic-dna-analysis-ce/str-amplification/powerplex-fusion-6c-system/>
- PowerPlex® Y23 System*. (s. f.). Recuperado 8 de abril de 2025, de <https://www.promega.es/products/forensic-dna-analysis-ce/str-amplification/powerplex-y23-system/>
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37-45. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90017-W](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90017-W)
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012a). PCR inhibitors—Occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Scorrano, G., Valentini, F., Martínez-Labarga, C., Rolfo, M. F., Fiammenghi, A., Lo Vetro, D., Martini, F., Casoli, A., Ferraris, G., Palleschi, G., Palleschi, A., & Rickards, O. (2015). Methodological strategies to assess the degree of bone preservation for ancient DNA studies. *Annals of Human Biology*, 42(1), 10-19. <https://doi.org/10.3109/03014460.2014.954614>
- Shewale, J. G., Qi, L., & Calandro, L. M. (2012). Principles, Practice, and Evolution of Capillary Electrophoresis as a Tool for Forensic DNA Analysis. *Forensic Science Review*, 24(2), 79-100.
- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 2009-2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- Starinsky-Elbaz, S., Ram, T., Voskoboinik, L., & Pasternak, Z. (2020). Weight-of-evidence for DNA identification of missing persons and human remains using CODIS. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 16(3), 389-394. <https://doi.org/10.1007/s12024-020-00248-x>
- Sullivan, K. M., Hopgood, R., & Gill, P. (1992). Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine*, 105(2), 83-86. <https://doi.org/10.1007/BF02340829>
- Sutlovic, D., Gamulin, S., Definis-Gojanovic, M., Gugic, D., & Andjelinovic, S. (2008). Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and

- kinetics. *ELECTROPHORESIS*, 29(7), 1467-1472.
<https://doi.org/10.1002/elps.200700699>
- Tebbe, C. C., & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2657-2665. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC182335/>
- Timken, M. D., Klein, S. B., & Buoncristiani, M. R. (2014). Stochastic sampling effects in STR typing: Implications for analysis and interpretation. *Forensic Science International. Genetics*, 11, 195-204.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.03.015>
- Tuross, N. (1994). The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50(6), 530-535. <https://doi.org/10.1007/BF01921721>
- Vinueza-Espinosa, D. C. (s. f.). *Extraction and Genetic Characterization from Human Skeletal Remains*.
- Xiao, C., Yang, X., Liu, H., Liu, C., Yu, Z., Chen, L., & Liu, C. (2021). Validation and forensic application of a new 19 X-STR loci multiplex system. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 53, 101957. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.101957>
- Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit*. (s. f.). Recuperado 3 de febrero de 2025, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/es/4482730>
- Zhang, Y., Yu, Z., Mo, X., Zhao, X., Li, W., Liu, H., Liu, C., Wu, R., & Sun, H. (2021). Development and validation of a new 18 X-STR typing assay for forensic applications. *Electrophoresis*, 42(6), 766-773.
<https://doi.org/10.1002/elps.202000168>

8. APÉNDICE.

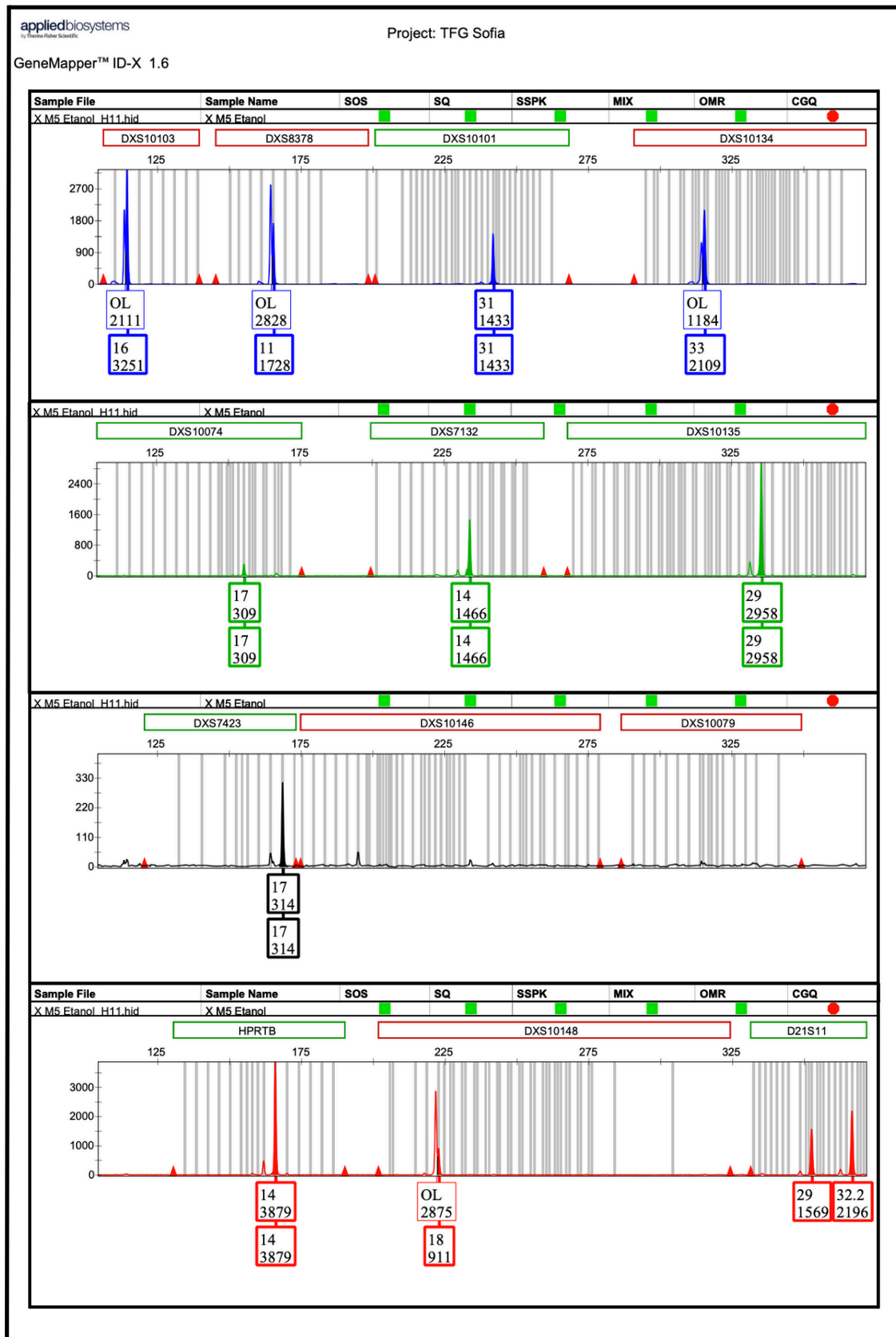
Apéndice 1. Características de los marcadores STR amplificados con cada kit de PCR. Fuente: elaboración propia (2025) adaptada de (Vinueza-Espinosa, s. f.).

Marcadores STR				Kits de amplificación de STR				
Ubicación citogenética	Locus STR	Secuencia repetida	Rango alélico	GlobalFiler IQC	Yfiler Plus	PowerPlex Fusion 6C	PowerPlex Y23	Investigator Argus X-12
1q42	D1S1656	TAGA	10 a 19,3	2		3		
2p14	D2S441	TCWA	8 a 17	1		4		
2p25,3	TPOX	AATG	4 a 16	5		6		
2q35	D2S1338	TKCC	15 a 27	4		3		
3p21,31	D3S1358	TCTR	11 a 24	1		2		
4q28	FGA	TTTC	12,2 a 51,2	4		4		
5q23,2	D5S818	AGAT	7 a 15	2		5		
5q33,1	CSF1PO	AGAT	7 a 15	4		4		
6q14	SE33	AAAG	6,3 a 36	5				
7q21,11	D7S820	GATA	6 a 14	4		4		
8q24,13	D8S1179	TCTR	8 a 18	3		1		
10q26,3	D10S1248	GGAA	8 a 19	1		5		
11p15,5	TH01	TCAT	5 a 11	3		1		
12p13,2	D12S391	AGAY	14 a 27	3		2		
12p13,31	vWA	TAGA	10 a 26	2		2		
13q31,1	D13S317	TATC	8 a 15	3		6		
15q26,2	PENTA E	AAAGA	5 a 25			7		
16q24,1	D16S539	GATA	5 a 15	3		1		
18q21,33	D18S51	AGAA	9 a 28	5		2		
19q12	D19S433	WAGG	9 a 18,2	2		3		
21q21,1	D21S11	TCTA	12 a 41,2	4		3		3
21q22,3	PENTA D	AAAGA	1,1 a 22			5		
22q12,3	D22S1045	ATT	8 a 19	1		5		
X: p22,1-22,3; Y: p11,2	Amelogenin	-	-	2		1		1
Yp11,2	DYS576	AAAG	10 a 25		1		1	
Yp11,2	DYS570	TTTC	10 a 26		1		1	
Yp11,2	DYS481	CTT	17 a 32		3		2	
Yq11,2	DYS458	GAAA	11 a 24		2		2	
Yq11,2	DYS19	TCTA	9 a 19		3		5	
Yq11,2	DYS456	AGAT	10 a 24		1		4	
Yq11,2	DYS393	AGAT	7 a 18		1		1	
Yq11,21	DYS391	TCTA	5 a 16	6	6	7	1	
Yq11,21	DYS437	TCTA	10 a 18		2		6	
Yq11,221	Y-indel	TTCTC/-	"1" o "2"	1				
Yq11,221	DYS438	TTTTT	6 a 16		3		5	
Yq11,221	YGATAH4	TCTA	8 a 18		4		5	
Yq11,221	DYS643	CTTTT	4 a 17				6	
Yq11,221	DYS390	TAGA	17 a 29		2		3	
Yq11,221	DYS439	GATA	6 a 17		2		4	
Yq11,222	DYS385ab	TTTC	6 a 28		3		3	
Yq11,222	DYS549	GATA	5 a 16				3	
Yq11,223	DYS392	ATA	4 a 20		4		5	
Yq11,223	DYS460	TCTA	7 a 14		1			
Yq12	DYS635	TAGA	15 a 30		3		2	
Yq12	DYS533	TATC	7 a 17		5		4	
Yq	DYS449	TTTCT	22 a 40		4			
Yq	DYS627	AGAG	11 a 27		5			
Yq	DYS389I	TAGA	9 a 17		2		2	
Yq	DYS389II	TAGA	24 a 35		4		4	
Yq	DYS518	AAAG	32 a 49		5			
Yq	DYS448	AGAGAT	14 a 24		5		3	
Yq	DYF387S1	AAAGG	30 a 44		4			
Xq12	DXS7132	TAGA	11 a 17					2
Xq12	DXS10074	AAGA	7 a 21					1
Xq12	DXS10079	AGAA	14 a 25					3
Xp22,2	DXS8378	CTAT	8 a 15					3
Xp22,31	DXS10135	AAGA	13 a 39,2					3
Xp22,31	DXS10148	GGAA	13,3 a 38,1					2
Xq26,2	HPR1B	ATCT	9 a 17					1
Xq26,3	DXS10101	AAAG	24 a 35					4
Xp26	DXS10103	TAGA	14 a 21					2
Xq28	DXS7423	TCCA	12 a 18					1
Xp28	DXS10134	GAAA	32 A 44					5
Xq28	DXS10146	TTCC	24 a 46					2

Color	Azul	Verde	Amarillo	Rojo	Morado
DYE	6-FAM™	VIC™	NED™	TAZ™	SID™

Anotación 1. Características de los marcadores extraídos de la base de datos STR NIST (NIST STRBase, s. f.). El número del interior de los cuadros de color indican la posición relativa del tamaño de ese locus dentro del canal de color específico para ese kit en concreto.

Apéndice 2. Electroferograma obtenido a partir del kit Investigator Argus X-12 en presencia de etanol para la muestra M5. Fuente: obtenido del programa GeneMapper ID-X Software v1.4.



Apéndice 3. Electroferograma obtenido a partir del kit Investigator Argus X-12 en presencia de etanol para la muestra de RO. Fuente: obtenido del programa GeneMapper ID-X Software v1.4.

