Manuel C. Crespillo Márquez
Pedro A. Barrio Caballero
(Editores)

GENÉTICA FORENSE
Del laboratorio a los Tribunales

Madrid • Buenos Aires • México • Bogotá

© Manuel C. Crespillo Márquez y Pedro A. Barrio Caballero, 2019

Reservados todos los derechos.

«No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright.»

Ediciones Díaz de Santos
Internet: http//www.editdiazdesantos.com
E-mail: ediciones@editdiazdesantos.com

ISBN: 978-84-9052-213-4
Depósito Legal: M-37475-2018

Fotocomposición y diseño de cubiertas: P55 Servicios Culturales

Printed in Spain - Impreso en España

ÍNDICE

Agradecimientos ..... **VII**
Sobre los autores ..... **XI**
Prólogo ..... **XIX**
Introducción ..... **XXI**

1. Historia y evolución de la genética forense. Grupos de trabajo de estandarización científica / *Ulises Toscanini* 1

2. La calidad en los laboratorios de Genética Forense. La implantación de la Norma ISO/IEC 17025:2017 / *Coro Fernández Oliva* 23

3. Efectos de la contaminación, transferencia y persistencia del ADN en la interpretación de la prueba genética / *Manuel C. Crespillo Márquez* 51

4. Recogida y remisión de muestras para estudios de identificación genética. Caracterización de vestigios biológicos / *Lourdes Fernández de Simón Loro* 79

5. Técnicas actuales de extracción de ADN en Genética Forense / *Miguel Rafael Paredes Herrera* 107

6. Cuantificación de ADN humano / *Mª Victoria Prieto Ruiz-Canela* 133

7. Marcadores STR autosómicos de interés forense: amplificación y artefactos / *Álex Pifarré Rubbel* 161

8. Detección de polimorfismos: la electroforesis capilar / *Ruth Pérez Vergas* 189

9. Análisis de marcadores STR de cromosoma Y /
Vánia Pereira, Leonor Gusmão 217

10. Análisis de ADN mitocondrial /
Manuel López Soto 241

11. Marcadores fenotípicos de interés forense /
Ana Freire-Aradas, Victoria Lareu Huidobro, Ángel Carracedo 269

12. Genética forense no humana /
Manuel Oliveira, Miguel Arenas, Nadia Pinto, Antonio Amorim 291

13. Nuevas tecnologías de secuenciación masiva en paralelo (MPS) de uso en Genética Forense /
Pedro A, Barrio Caballero, Pablo Martín Martín, Antonio Alonso 319

14. Estudio de las relaciones de parentesco /
Juan Antonio Luque Gutiérrez 351

15. Interpretación y valoración estadística de perfiles genéticos mezcla. Problemática asociada, repercusión, estrategias de mejora y evaluación de resultados /
Oscar García 383

16. Identificación de desaparecidos en gran escala: grandes catástrofes (DVI) y desapariciones en contextos de crisis humanitaria (MPI) /
Carlos M. Vullo 405

17. Las bases de datos de ADN de interés forense /
Antonio Alonso Alonso 425

18. El valor de la prueba de ADN /
Lourdes Prieto, Ángel Carracedo 445

19. Informe pericial en materia de Genética Forense. Requisitos, estructura y ejemplos /
Pedro A. Barrio Caballero, Manuel C. Crespillo Márquez 471

20. Aspectos jurídicos y bioéticos del uso forense del ADN /
Ignacio Acón Ortego 495

SOBRE LOS AUTORES

■ LOS EDITORES

Manuel C. Crespillo Márquez

Jefe del Servicio de Biología del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF, Ministerio de Justicia, España) del Departamento de Barcelona desde 2014. Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada (1989) y doctorado en Medicina (2013) por la Universidad de Zaragoza. Master en Bioingeniería por la Universidad Politécnica de Cataluña (1992). Es profesor asociado de la Universidad Pompeu y Fabra desde 2006 y miembro de la Comisión Técnica Permanente Nacional para el uso forense del ADN (CNUFADN). Ha sido coordinador de algunos grupos de trabajo del GHEP-ISFG (Comisión de Mezclas, Comisión de ADNmt). Es autor de numerosas publicaciones y trabajos en revistas nacionales e internacionales en el campo de la genética forense.

Pedro A. Barrio Caballero

Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Facultativo del Servicio de Biología del INTCF desde 2010, actualmente en el Departamento de Madrid. Ha trabajado e investigado en el campo de la Antropología Forense, Genética de Poblaciones y Genética Forense desde el 2000, con diversas publicaciones en revista nacionales e internacionales. Miembro activo del GHEP-ISFG, como coordinador de la Comisión de Mezclas (GHEPMIX). Ha participado en la validación de los procedimientos de trabajo del Servicio de Biología del Departamento de Barcelona del INTCF para su acreditación de acuerdo a la ISO/IEC 17025:2005. Actualmente forma parte del equipo investigador del proyecto europeo DNASeqEx (*DNA-STR Massive Sequencing & International Information Exchange*).

■ LOS COLABORADORES

Ignacio Acón Ortego

Juez-Magistrado. Ingresó en la carrera judicial por el sistema de oposición libre en 2006. En la actualidad, es titular del Juzgado de Primera Instancia e Instrucción nº. 2 de Calahorra (La Rioja). Desde marzo 2012 hasta marzo 2017 desempeñó una comisión de servicios en el Ministerio de Justicia, como asesor en la Dirección General de Relaciones con la Administración de Justicia, participando en numerosas actuaciones y proyectos legislativos. En la misma fecha ejerció el cargo de Vocal titular de la CNUFADN y Vocal coordinador del Grupo Jurídico y Bioético de la Comisión. Ha sido director y ponente en varios cursos relacionados con el ADN forense del Plan de Formación del Consejo General del Poder Judicial, del Centro de Estudios Jurídicos y de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo. Cuenta con diversas publicaciones sobre la materia.

Antonio Alonso Alonso

Facultativo del Servicio de Biología del INTCF de Madrid desde 1984. Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid en 1992. Presidente de la GHEP-ISFG durante el período 1996-2000. Secretario de la Comisión Nacional para el Uso Forense del ADN desde 2008. Perito experto en genética forense en diferentes Tribunales españoles, así como en el Tribunal Internacional para la Antigua Yugoslavia. Miembro activo de las siguientes sociedades científicas: ISFG, ENFSI y ISABS. Ha publicado más de 100 artículos en revistas internacionales y libros de ciencias forenses. Su proyecto europeo de investigación más reciente consiste en el desarrollo, la validación y la implementación de la tecnología de secuenciación masiva para el análisis de marcadores STR en la Bases de Datos de ADN forenses (DNASeqEx).

Antonio Amorim

Profesor Titular de la Facultad de Ciencias de la Universidade do Porto desde 1993, y líder del Grupo "Genética Populacional e Evolução" del IPATIMUP/i3s (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde de la Universidade do Porto, Portugal). Ha dirigido sociedades científicas y profesionales (Sociedad Portuguesa de Genética Humana, GHEP–ISFG), programas académicos (Master – Genética Forense, FCUP; Doctorado – Biología FCUP y GABBA, UP) e institutos de investigación (IPATIMUP). Sus intereses de investigación se centran en genética formal y de poblaciones, pura y aplicada: forense (humana y no-humana, identificación individual y taxonómica, parentesco) y diagnóstico de enfermedades hereditarias.

Miguel Arenas

Investigador principal "Ramón y Cajal" del Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Universidad de Vigo. Obtuvo el Doctorado en el año 2010 con premio a mejor Tesis y posteriormente realizó periodos postdoctorales en la Universidad de Berna (Suiza), Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid), University of Wyoming (USA) y en el IPATIMUP/i3s (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde de la Universidade do Porto, Portugal). El investigador está especialmente interesado en el desarrollo de modelos, métodos y herramientas para la simulación y análisis evolutivo de datos genéticos. Además, está interesado en el estudio de la evolución de los organismos a nivel molecular y poblacional.

Ángel Carracedo

Catedrático de Medicina Legal de la Universidad de Santiago. Director del Centro Nacional de Genotipado (PRB2, ISCIII) y de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (Consellería de Sanidad-Xunta de Galicia). Ha publicado 10 libros y más de 600 artículos en revistas de impacto incluyendo artículos en *Nature*, *Science*, *Nature Genetics*, además de las principales revistas de Medicina Forense. Presidente de la Academia Internacional de Medicina Legal. Ex-presidente de la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG). Editor jefe de *Forensic Science International: Genetics*. Miembro de organismos reguladores, consorcios internacionales de investigación y comités internacionales (EMA, IRDiRC, CNUFADN, Comité forense Cruz Roja Internacional). Ha recibido numerosos premios entre los que destacan el Premio Rey Jaime I de investigación, Medalla Adelaida, Medalla Galien, Premio Nacional de Genética, Medalla de Oro de Galicia, Premio Prismas, y el Premio Novoa Santos, entre otros. Doctor *Honoris Causa* por varias universidades.

Lourdes Fernández de Simón Loro

Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla (1981) y Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (1984). En la actualidad es Facultativo del Servicio de Biología del Departamento de Madrid del INTCF con más de 33 años de experiencia en casuística forense. Especialista en la investigación e identificación de vestigios biológicos de interés forense. Con más de 75 publicaciones y comunicaciones a congresos, ha colaborado en diversos proyectos y grupos de trabajo sobre *cadena de custodia y recogida de muestras biológicas con fines de identificación genética*.

Coro Fernández Oliva

Doctora en Biología por la Universidad de Alcalá (Madrid). Desde 2008, Facultativo del INTCF, primero en el Servicio de Biología del Departamento de Madrid, y desde 2012, en el Servicio de Garantía de Calidad. Entre sus funciones se halla la

implementación y gestión de la calidad principalmente en el Servicio de Biología y la coordinación del Ejercicio de Intercomparación, acreditado bajo la ISO/IEC 17043:2010 desde 2014, "Estudio de polimorfismos de ADN en manchas de sangre y otras muestras biológicas" que se organiza junto con el Grupo de Habla Española y Portuguesa de la *International Society for Forensic Genetics* (GHEP-ISFG).

Ana Freire-Aradas

Investigadora postdoctoral en el Instituto de Ciencias Forenses (ICF) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Licenciada en Farmacia en 2006 (USC), master en Medicina Molecular en 2008 (USC) y doctora con mención europea en 2013 (USC); bajo la supervisión de la Prof. Dra. Victoria Lareu y el Prof. Dr. Ángel Carracedo. Desde 2015 a 2017 realizó estancia postdoctoral en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Colonia (Alemania), reincorporándose posteriormente al ICF-USC. Intereses científicos en: análisis de marcadores SNPs para la inferencia de origen biogeográfico y características físicas; estudio de marcadores epigenéticos tales como la metilación del ADN, especialmente para la estimación de la edad; análisis de ADN degradado; evaluación de herramientas bioinformáticas para el desarrollo de modelos de predicción basados en el ADN.

Óscar García

Licenciado en Biología por la Universidad del País Vasco (UPV-EHU). Máster en Biotecnología Alimentaria por la Universidad Politécnica de Cataluña (UPC). Autor de más de 125 artículos en revistas internacionales de Genética Humana, Genética Forense y Medicina Legal, más de 40 comunicaciones en congresos internacionales y varios capítulos en libros. Revisor de artículos para publicación en diversas revistas (*Forensic Science Internacional: Genetics*, *Forensic Science International*, *Journal of Forensic Sciences and Medicine*, *Molecular Biology Reports*, *Revista de Derecho y Genética Humana*, *Revista de Ciencias Forenses de Honduras*, etc.). Presidente del GHEP-ISFG (2000-2004) y Vice-Presidente de dicha sociedad (2004-2008). Miembro de la CNUFADN de España (2008-Actualidad).

Leonor Gusmão

Tiene un doctorado en Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Oporto (FCUP), Portugal. Desde 2014 es profesora en la Universidad Estatal de Río de Janeiro (UERJ), Brasil, trabaja en genética poblacional y forense (ResearcherID: B-3122-2013; Scopus Author ID: 7004400849). Actualmente es miembro del Comité Ejecutivo de ISFG (Sociedad Internacional de Genética Forense) y Editor Asociado de la revista *Forensic Science International: Genetics*. Elsevier, Reino Unido (ISSN: 1872-4973).

Mª Victoria Lareu

Catedrática de Medicina legal y directora del Instituto de Ciencias Forenses "Luís Concheiro" de la Universidad de Santiago de Compostela. Las líneas de investigación actuales son siempre en el campo de la genética forense sobre todo en el análisis del ADN o ARN buscando marcadores de identificación individual (STRs, SNPs, InDels), búsqueda de marcadores para determinación de características físicas y ancestralidad, búsqueda de marcadores epigenéticos con aplicaciones forenses. Siendo investigador principal o colaborador de proyectos de investigación tanto de la comunidad autónoma, nacionales o europeos. Con su grupo ha publicado 209 artículos de carácter científico la mayoría de ellos en el ámbito de la genética forense. Ha dirigido 23 tesis doctorales muchas de ellas con premio extraordinario de doctorado. En el ámbito de la práctica de la genética forense ha sido reconocida con la Medalla al Mérito de con Distintivo Blanco de la Guardia Civil.

Manuel López Soto

Jefe del Servicio de Biología del Departamento de Sevilla del INTCF y Profesor Asociado del Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla en el Área de Genética. Es Licenciado y Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla. Es miembro de la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG) y del Grupo de Habla Española y Portuguesa de la ISFG (GHEP-ISFG), del que ha sido miembro de su Comité Ejecutivo durante el período 2008-2012. Su labor profesional se centra en el análisis de vestigios biológicos, en la investigación biológica del parentesco por técnicas de ADN y en la emisión de dictámenes periciales para los Tribunales de Justicia.

Juan Antonio Luque Gutiérrez

Licenciado en Farmacia por la Universidad de Granada. Facultativo del Servicio de Biología del INTCF de Barcelona desde 1989. Jefe del Servicio del mismo desde 2004 hasta 2014. Ha realizado, supervisado y defendido ante los Tribunales cientos de informes periciales. Coordinador de varios grupos actualmente extintos del GHEP-ISFG (Grupo de trabajo de Bases de Datos de ADN mitocondrial, Grupo de estadística, Grupo de paternidades). Coordinador del GHEPMIX desde su creación hasta la actualidad. Creador del programa *PatPCR* para cálculo de paternidades simples y del programa *LRMezclas* para la valoración estadística de mezclas de ADN en muestras forenses (aplicaciones *Excel*). Coordinador de desarrollo e implementación en el INTCF del aplicativo *LIMS*. Autor de múltiples artículos y capítulos de libros en el ámbito de la genética forense, así como ponente en cursos del mismo ámbito. Miembro de la *Paternity Testing Comision* de la ISFG [*'ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing', Forensic Sci Int Genet. 2007;1(3):223-231*].

Pablo Martín Martín

Licenciado en Ciencias Biológicas y máster en Biotecnología por la Universidad Complutense de Madrid. Desde 1993, facultativo del Servicio de Biología del INTCF de Madrid. Experto en genética forense, especializado en Identificación genética de restos cadavéricos, con conocimientos de los procedimientos aplicados en la resolución de casos forenses. Activa participación en programas de validación de nuevas técnicas incorporadas en el campo, especialmente sobre nuevos marcadores de amplificación y técnicas de secuenciación masiva.

Manuela Oliverira

Investigadora asistente del Grupo "Genética Populacional e Evolução" del IPATIMUP/i3s (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde de la Universidade do Porto, Portugal), y Profesora Auxiliar Invitada en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade do Porto (FCUP). Licenciada en Biología (FCUP, 1999), Máster en Recursos Genéticos y Mejora de Especies Agrícolas y Forestales (UTAD, 2003) y Doctora en Biología (FCUP, 2009). Sus intereses de investigación se centran en la detección y genotipado de microorganismos (hongos y bacterias) con diferentes aplicaciones, desde Salud Publica hasta Agricultura.

Miguel R. Paredes

Facultativo del Servicio de Biología del INTCF, destinado actualmente en el Departamento de Barcelona. Posee la titulación de Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada. Inició su carrera profesional en el ámbito de la enseñanza para pasar a continuación al área de la genética forense, donde lleva acumulados más de veinte años de experiencia.

Vânia Pereira

Tiene un doctorado en Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Oporto, Portugal. Ha estado trabajando en el campo de genética poblacional y forense desde 2007 (ORCID ID: 0000-0002-8789-5286; Scopus Author ID: 26428331700). Desde 2015 es Profesora Asistente en el Departamento de Medicina Forense de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Copenhague, Dinamarca.

Ruth Pérez Vergas

Facultativa del Servicio de Biología en el Departamento de Barcelona del INTCF desde el año 2012. Se doctoró en el Dpto. de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid, España) en 2008. Posteriormente trabajó como investigadora postdoctoral en la unidad UMR-LEG (*Unité Mixte de Recherche en Génétique et Ecophysiologie des Légumineuses à Graines*) de INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*) en Dijon (Francia).

Álex Pifarré Rubbel

Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Barcelona (UB) en el año 1993. Becario predoctoral en el Servicio de Oncología del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, trabajando en aspectos genéticos relacionados con el desarrollo de diversos cánceres. Doctor en Ciencias Biológicas por la UB en 1998. Becario posdoctoral en el Servicio de Neurología del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (1998-1999). Desde 1999, Facultativo en el Servicio de Biología del Departamento de Barcelona del INTCF, excepto entre 2008-2010, en que fue miembro de la Escala de Soporte de los Mossos d'Esquadra en calidad de Facultativo Biólogo en la División de Policía Científica.

Nadia Pinto

Investigadora posdoctoral del Grupo "Genética Populacional e Evolução" del IPATIMUP/i3s (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde de la Universidade do Porto, Portugal) y del Centro de Matemática de la Universidade do Porto (CMUP). La investigadora es Licenciada en Matemática – Rama Educativa (FCUP, 2003), Master en Ingeniería Matemática (FCUP, 2006) y Doctora en Matemática Aplicada (FCUP, 2012). Sus intereses de investigación se centran en la genética formal y de poblaciones, modelización de parentescos y cuantificación de prueba, así como estudios de asociación.

Lourdes Prieto

Doctora en Biología Forense. Investigadora colaboradora del Grupo de Medicina Xenómica, Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro, Universidad de Santiago de Compostela. Ha publicado más de 50 artículos en revistas forenses de impacto, así como en revistas del campo de la microbiología ambiental. Presidenta del Grupo de Habla Española y Portuguesa de la *International Society for Forensic Genetics* (2008-2012), actualmente es vice-presidenta de esta sociedad (GHEP-ISFG). Consultor externo del *International Committee of Red Cross* desde 2009, asesorando en la investigación de casos de violaciones de los derechos humanos en el entorno internacional (Chile, Chipre, Colombia, El Salvador, Guatemala, Iraq, México, Ucrania, entre otros). Miembro de la Comisión Nacional para el uso forense del ADN (CNUFADN, Comisión técnica permanente) durante 2009-2014.

Mª Victoria Prieto

Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, tras una breve experiencia de dos años trabajando en control de calidad en la empresa privada, en 1989 ingresó en el Servicio de Biología del Departamento de Sevilla del INTCF, dónde hasta el día de hoy ha desarrollado su carrera profesional al servicio del Ministerio de Justicia (España), colaborando en la resolución de casos judiciales en materia de biología forense.

Ulises Toscanini

Bioquímico de la Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina (1993) y Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España (2011). Es profesor del Departamento de Biología de la Universidad Favaloro (Buenos Aires, Argentina) y Director del Laboratorio PRICAI (Primer Centro Argentino de Inmunogenética) de la Fundación Favaloro. Sus áreas de trabajo e investigación son la genética de poblaciones, genética forense, histocompatibilidad e inmunogenética y diagnóstico genético. Es miembro fundador de la Sociedad Argentina de Genética Forense (SAGF, 2010), siendo su Presidente entre 2010-2012. Secretario (2012-2016) y actualmente Presidente del GHEP-ISFG.

Carlos Vullo

Bioquímico y Doctor en Ciencias Químicas graduado en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Fue fundador y Director del Laboratorio de Histocompatibilidad del Hospital Nacional de Clínicas, UNC desde el año 1981 hasta el 2003. Es Director del Laboratorio de Genética Forense del Equipo Argentino de Antropología Forense (EAAF) desde 2007 hasta la fecha y ha aplicado la genética forense para la identificación de desaparecidos en más de 15 países. Ha publicado más de 60 artículos científicos en el campo de la Inmunogenética y la Genética Forense.

INTRODUCCIÓN

La Genética Forense es una apasionante disciplina científica en constante evolución. Tradicionalmente se la ha considerado como una subespecialidad de la Genética y de la Medicina Legal. Sin embargo, en los últimos años ha adquirido una entidad propia, su evolución va ligada a la revolución tecnológica de las últimas décadas. Hoy en día se ha consolidado como una herramienta de indudable utilidad en el quehacer diario de los Tribunales de Justicia, dando respuesta a los retos que se plantean desde el ámbito judicial. Desde la introducción de la huella genética en 1985 por Alec Jeffreys, ha habido una evolución continua en el tipo de marcadores y en las tecnologías utilizadas. Sin embargo, como ya ponía de manifiesto el profesor Ángel Carracedo[a], "los retos prioritarios de la genética forense no son esencialmente tecnológicos: la valoración estadística de la prueba del ADN en los casos complejos (particularmente en mezclas o muestras de contacto), la comunicación del valor de la prueba, el control de calidad, el futuro de la I+D, la formación, los estándares éticos, entre otros, son problemas a los que nos tenemos que enfrentar con urgencia".

Pero además, hay que hacer frente a otros retos que se presentan en una sociedad globalizada, donde los medios de comunicación juegan un papel de gran importancia. De este modo, series de televisión como *CSI*, *NCIS*, *La Ley y el Orden* o *Mentes Criminales*, que tanto impacto y audiencia tienen, despiertan inquietudes en los televidentes y han conseguido socializar esta disciplina de la ciencia aplicada, hasta el extremo de que el receptor de estas series está normalizando conceptos y conocimientos (como *ADN*, *secuenciación*, base de datos *CODIS*,…), antes restringidos a los especialistas que trabajaban en el ámbito de la Genética Forense. Si añadimos algunos casos mediáticos (como el de OJ Simpson en EE UU, Amanda Knox en Italia, Eva Blanco en España,…), se pone de manifiesto la necesidad de una comunicación clara y fluida con distintos interlocutores, no solo con los colectivos judiciales (magistrados, jueces, fiscales o abogados), sino también con la sociedad en general, ya que la introducción de los jurados en el marco jurídico de algunos países, tendrán su efecto en la comunicación de la pericia. En este marco,

a Carracedo A, Salas A, Lareau MV. Problemas y retos de futuro de la genética forense en el siglo XXI. *Cuad Med Forense* 2010; 16(1-2): 31-35.

ya se están desarrollando algunas iniciativas, como la de *Sense about Science*[b], cuya guía en inglés destinada al público en general ya se está traduciendo a otros idiomas, entre ellos, al español.

Por otro lado, se ha de tener en cuenta que, de manera mayoritaria, los textos científicos, y entre ellos los relativos a la Genética Forense, se encuentran redactados en inglés. Es evidente que para una mayor difusión de la ciencia, generada en cualquier país, se ha de utilizar aquel idioma más extendido. Independientemente de los artículos científicos publicados en revistas de impacto (como: *Forensic Science International: Genetics*, *Journal of Forensic Sciences*, *Science & Justice*, *Journal of Forensic and Legal Medicine*,…), existen grandes obras de referencia dentro del campo de la Genética Forense[c], todas ellas publicadas en inglés. Sin embargo, cada vez se están demandando más textos en español.

Este libro aspira a aportar un pequeño grano de arena al conocimiento de la Genética Forense, y en particular, al conocimiento de la Genética Forense en español. Son escasos los libros de esta área publicados en lengua española, a pesar de disponer de uno de los grupos de trabajo más importantes dentro de la Sociedad Internacional de Genética Forense (*International Society for Forensic Genetics – ISFG*), el Grupo de Habla Española y Portuguesa (GHEP-ISFG), que agrupa a más de 150 laboratorios pertenecientes a 23 países de habla española o portuguesa, con excelentes profesionales y una notable productividad científica. Insistimos que, sin ningún tipo de pretensión, con este libro perseguimos, si no llenar un vacío, sí al menos contribuir a llenarlo.

Creemos que este texto es bastante completo, y abarca todos los grandes temas que competen a la Genética Forense. Somos muy consciente de la temporalidad del mismo, como hemos indicado, debido a la constante evolución de las tecnologías dentro de la genética forense, y a las próximas revoluciones que se esperan en los próximos 5-10 años. Solo hay que echar un vistazo a las principales revistas científicas de esta área de conocimiento. No obstante, también creemos que el contenido de este libro sientan una robusta base conceptual (en español), que podrá servir para futuras (y necesarias) actualizaciones y revisiones.

■ PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y CONTENIDO DE ESTE LIBRO

Esta obra pretende ofrecer una visión actualizada de la genética forense desglosando la temática en tres bloques de contenidos. El primer bloque incluye tres capítulos, en los que se tratan aspectos generales de la Genética Forense y de los laboratorios que se dedican a este campo, haciendo una revisión de la historia y

b Sense about Science, Euroforgen. Making sense of Forensic Genetics. 2017. [acceso en junio de 2018]. Disponible en: http://senseaboutscience.org/wp-content/uploads/2017/01/making-sense-of-forensic-genetics.pdf

c Por ejemplo, los libros de John M. Butler: *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (2010), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (2011), *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation* (2014).

evolución de la Genética Forense fundamentalmente a través de sus grupos trabajo y sociedades científicas que reman para la evolución y estandarización de esta disciplina (Capítulo 1). El Capítulo 2 pretende dar respuesta a una de las facetas más alejadas del genetista forense y que, sin embargo, es más requerida por los estándares de calidad internacionales e incluso por la legislación de algunos países. El capítulo ofrece al lector una visión de los aspectos fundamentales para la implantación de un sistema de calidad en los laboratorios de Genética Forense (Norma ISO/IEC 17025:2017). Este bloque se cierra analizando uno de los *talones de Aquiles* de la prueba genética, la contaminación, su trascendencia y su repercusión en el curso de la investigación. Para ello se incluyen algunos casos de importante repercusión mediática que tratan de ofrecer una perspectiva práctica al lector (Capítulo 3).

En un segundo bloque se incluye un conjunto de 10 capítulos que tratan sobre aspectos más técnicos y metodológicos dentro de la Genética Forense. Se inicia este bloque abordando una fase de gran trascendencia en el análisis genético, como es la recogida de indicios y su remisión a los laboratorios forense, así como de las metodologías aplicadas para la caracterización de fluidos biológicos y otros indicios (Capítulo 4). Se revisan las bases moleculares del proceso de extracción de ADN en los distintos métodos empleados para la recuperación de ADN a partir de las evidencias (Capítulo 5), así como una visión actualizada de los métodos de cuantificación de ADN humano (Capítulo 6). En el Capítulo 7 se analizan los marcadores genéticos que actualmente son de un uso más extendido en el campo de la Genética Forense, los marcadores *STR*, incluyendo las dificultades y retos que supone su análisis. Dentro de este bloque también se incluye el Capítulo 8, que analiza el fundamento de una de las principales técnicas que actualmente se aplican para la detección de polimorfismos de ADN, la electroforesis capilar, ofreciendo una visión práctica de su uso, incidencias y posibles soluciones a éstas. Los Capítulos 9 y 10, revisan los llamados marcadores haplotípicos, marcadores del cromosoma Y y el ADN mitocondrial, de indudable utilidad en genética forense. Pero también se ha ofrecido una visión sobre el uso de otros marcadores que poco a poco se están introduciendo en las investigaciones genético forenses, los marcadores fenotípicos, y que prometen ser una herramienta de indudable utilidad en la resolución de casos forenses (Capítulo 11), y que ayudarán en casos complejos. El Capítulo 12 recoge una completa revisión que trata el análisis de evidencias o restos de origen no humano (animales, plantas, microorganismos). Para cerrar este bloque, el Capítulo 13 repasa de forma detallada las nuevas técnicas de secuenciación masiva (MPS) que se están comenzando a validar y aplicar al campo de la genética forense, tanto para aplicaciones clásicas como en otras nuevas vías de investigación.

Finalmente, el tercer bloque de este libro, versa sobre aspectos relacionados con la interpretación de los resultados obtenidos en la prueba genética. Con ello, el primer capítulo de este bloque trata sobre el estudio genético de las relaciones de parentesco, con el análisis tanto de las paternidades simples como complejas (Capítulo 14). El siguiente tema se centra en los denominados “perfiles de ADN

críticos", como son las mezclas o aquellos en los que el ADN está en baja cantidad y/o degradado y que suponen uno de los grandes retos con los que se enfrentan los laboratorios de Genética Forense (Capítulo 15). El Capítulo 16 desarrolla otros casos concretos, como la identificación genética en grandes catástrofes o de personas desaparecidas. En el Capítulo 17, se revisa la importancia y la trascendencia de las bases de datos de datos de ADN de interés criminal y su uso para la resolución de casos judiciales con una visión mundial. La valoración (estadística) de la prueba genética y su presentación ante los tribunales de justicia es desarrollado en el Capítulo 18, tratando aquellos aspectos más relevantes y críticos de esta fase del análisis. El Capítulo 19 desarrolla el formato de los informes periciales en materia de análisis genéticos, exponiendo las características y requerimientos de los mismos, de acuerdo con los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017, incidiendo en la expresión de resultados y conclusiones, ofreciendo herramientas al lector, mediante la presentación de ejemplos y estrategias de comunicación. Este último bloque se cierra con un imprescindible capítulo sobre los aspectos legales y bioéticos del estudio del ADN con fines de identificación forense y su repercusión en el proceso judicial (Capítulo 20).

Para el desarrollo de todos estos contenidos, se ha pretendido dar una visión práctica, buscando un objetivo didáctico. Así, en todos aquellos temas que se han prestado a ello se han presentado ejemplos que ayuden al lector a una mejor comprensión o aplicación de los contenidos, o casos reales que ilustran de manera fidedigna algunos de los aspectos tratados en los diferentes capítulos. Todo ello para buscar la mejor forma de ilustrar los temas tratados y hacerlos lo más comprensibles posible. Este libro intenta dar respuesta a la necesidad de textos de referencia de calidad en español dentro del campo de la Genética Forense, así como servir de divulgación de esta área de conocimiento.

Manuel C. Crespillo
Pedro A. Barrio
Los Editores

HISTORIA Y EVOLUCIÓN DE LA GENÉTICA FORENSE. GRUPOS DE TRABAJO DE ESTANDARIZACIÓN CIENTÍFICA

Ulises Toscanini[1]

[1]*PRICAI – FUNDACIÓN FAVALORO. Av. Belgrano 1782, Subsuelo. C1093AAS, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina*
Autor para correspondencia: utoscanini@pricai.com.ar

1.1. INTRODUCCIÓN

Ana tiene 42 años, está casada con Marcos desde hace 20 y ambos tienen un hijo de 18. Tiempo atrás, antes de fallecer, su madre le confesó que ella no era realmente su madre, y sin dar más pistas abandonó este mundo. Ana comenzó a transitar un largo recorrido en búsqueda de sus orígenes. Ahora aguarda los resultados del estudio de ADN en la sala de espera del instituto en el que han realizado la prueba; sentada junto a ella está su supuesta madre, Josefina, a quien pudo llegar luego de años de peregrinaje burocrático en registros de nacimientos y a través de información brindada por personas que fue conociendo en ese camino. Marcos, el marido de Ana, que ha luchado junto a ella por conocer su verdad, la ha acompañado hasta allí, pero se ha quedado en el café de enfrente a pedido de ella. La puerta que dice "Entrega de Informes" en la sala de espera del instituto se abre y el secretario invita a Ana y a Josefina a pasar. Ambas mujeres caminan tensas, con una mezcla de angustia y ansiedad en sus miradas, hacia la oficina en la que la genetista forense les informará sobre el resultado de la prueba. En el café de enfrente, donde el marido de Ana espera, la gente tiene la mirada clavada en una pantalla de TV. Todos los medios están informando de que se ha hallado una coincidencia en la base de datos de ADN nacional con los perfiles genéticos de las evidencias recolectadas en la escena del crimen que ha mantenido al país en vilo durante las últimas semanas. Marcos disimula su nerviosismo, se mantiene ajeno a lo que ocurre a su lado y mientras bebe el último sorbo de café presiente que algo bueno ha ocurrido. Mira a través de la ventana del bar y puede ver a Ana y a su madre cruzando la calle sonrientes para encontrarse con él; sabe que esta vez la historia tiene un final feliz.

Ficción o realidad? Ambas. La línea entre ellas es cada vez más difusa. En poco tiempo la palabra ADN se ha metido en nuestros hogares, en los de casi todos los pueblos, países y continentes. En gran parte gracias a la rápida difusión de los descubrimientos y a la contribución de los medios de comunicación, pero básicamente debido al impacto social de los avances tecnológicos y científicos en este campo. Menos de 35 años han transcurrido hoy desde la utilización del ADN por primera vez en genética forense. Muchos de los que estamos escribiendo los capítulos de este libro hemos iniciado nuestras carreras casi con el comienzo del desarrollo de las metodologías de ADN aplicadas a la identificación de personas. Hemos elegido y aprendimos a amar esta disciplina a la par de su evolución. Somos realmente afortunados. Casi ha sido como ver crecer a un niño, aunque a un ritmo vertiginoso, al punto de que muchas expectativas se han cumplido antes de lo previsto. Si bien, la introducción de los estudios de ADN en genética forense ha revolucionado esta ciencia, debemos ir un poco más atrás para remontarnos a los primeros usos de las pruebas biológicas con fines de identificación.

1.2. EVOLUCIÓN DE LAS PRUEBAS EN GENÉTICA FORENSE

1.2.1. Los comienzos

Las pruebas biológicas con fines de identificación de personas comenzaron a utilizarse a principios del siglo XX, unas dos décadas después del descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos ABO por Lansteiner en 1901[1]. Durante varios años fue la única herramienta biológica a la que se pudo recurrir para tratar de dilucidar casos de paternidad. La limitante del sistema ABO es su bajo grado de polimorfismo, es decir, la escasa cantidad de variantes existentes entre los individuos de una población. Este hecho, sumado a la predominancia de algunos tipos sobre otros, limitaba la utilidad del sistema a un bajo porcentaje de casos en los que, a través de su análisis, fuese posible excluir la paternidad biológica de una persona con respecto a otra. Al sistema ABO se incorporaron otros sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios a medida que fueron descritos, como MNS, Kell, Kidd y otros, y posteriormente el análisis de isoformas de enzimas eritrocitarias y de proteínas séricas. Si bien individualmente cada sistema tiene un bajo poder de discriminación, la posibilidad de combinar la información de cada uno de ellos permitía mejorar sustancialmente la potencia de la prueba.

Sin duda el sistema que contribuyó de manera más notable a dar un salto en los estudios de paternidad hasta la aparición de los métodos de análisis de ADN, fue el sistema HLA (*Human Leucytes Antigens*). El sistema HLA fue descubierto hacia fines de la década de 1950 por su papel en las reacciones transfusionales y en el rechazo en los trasplantes de órganos[2-4]. Recién entrada la década de 1970, comenzó a utilizarse como prueba en casos de paternidad. Con la incorporación del estudio del sistema HLA a los sistemas ya disponibles se lograba incrementar el grado de certeza de la prueba de manera considerable. Por entonces, el estudio del sistema

HLA se realizaba a nivel fenotípico utilizando técnicas serológicas para identificar las variantes de estas proteínas expresadas en las membranas de los leucocitos. La complejidad del sistema HLA dada por la presencia del elevado polimorfismo residente en varios *loci*, el desequilibrio de ligamiento, la metodología de análisis, y la valoración estadística, requería un nivel de especialización elevado para su implementación. El inicio de la era del ADN estaba cerca.

1.2.2. La era del ADN

El descubrimiento de los ácidos nucleicos como medio de herencia[5] y la dilucidación de la estructura de la molécula del ADN (ácido desoxirribonucleico)[6] podrían considerarse como unos de los hallazgos científicos más importantes del siglo XX.

El primer polimorfismo de ADN fue descrito en 1980[7]. La utlización del estudio de polimorfismos de ADN en el campo forense vendría unos años más tarde gracias a la contribución de Alec Jeffreys y sus colaboradores en 1985[8], quienes basados en los descubrimientos de una región repetitiva en el gen de la mioglobina[9], introdujeron el método conocido como *DNA fingerprinting* o, en español, "huella genética" o "huella de ADN".

La secuencia de ADN identificada por Jeffreys y su equipo era una secuencia de 33 pares de bases de longitud repetida 4 veces en una zona no codificante del gen de la mioglobina. Cada unidad de repetición contenía a su vez una secuencia interna común a otras secuencias repetitivas dispersas en el genoma. Clivando el ADN genómico con enzimas de restricción y utilizando la técnica de *Southern blot*[10], se obtenía un patrón de bandas múltiples cuando se hibridaba el ADN con una sonda complementaria a la secuencia común identificada en el gen de la mioglobina, producto de la existencia de múltiples *loci* con esa secuencia dispersos en el genoma. A estas sondas diseñadas por Jeffreys se las llamó sondas multilocus o MLPs (del inglés *Multilocus Probes*). El patrón de bandas aparecía único para cada individuo, lo que le otorgaba un altísimo poder de discriminación. Las regiones repetitivas se denominaron VNTR, (*Variable Number of Tandem Repeats* o repeticiones en tándem de número variable) y la técnica se denominó RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* o "polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción").

En 1985 el desarrollo de Jeffreys se aplicó exitosamente en el Reino Unido para resolver una disputa de filiación en un caso de inmigración[11]. Al año siguiente, se utilizaría también por primera vez en el Reino Unido en un caso criminal, en el cual fue posible exonerar a un individuo y hallar al agresor de dos casos de violación seguida de muerte en un pueblo del condado de Leicestershire, Inglaterra. Este se convertiría en un caso emblemático. Es citado en muchos de los libros de texto como el inicio de esta era en la genética forense. El periódico inglés *The Guardian* ha vuelto a publicar esta historia en 2016 al cumplirse treinta años de este hecho[12].

No obstante, el poder de discriminación del método, la interpretación de los patrones de bandas obtenidos y la valoración estadística de los resultados era extremadamente compleja. El diseño de nuevas sondas permitió identificar poli-

morfismos de ADN minisatélites con secuencias repetitivas en tándem en número variable de localización genómica única[13]. A diferencia del uso de las sondas multilocus, con estas sondas se obtenían patrones de bandas más fáciles de interpretar, en los cuales para cada *locus* era posible observar un máximo de dos bandas por individuo, correspondientes a los alelos materno y paterno. Dado que las sondas de ADN utilizadas hibridaban en una única región del genoma, se las llamó sondas unilocus, o SLP (del inglés *Single Locus Probes*). Los alelos se nombraban por el tamaño en pares de bases estimado a partir de una muestra conteniendo fragmentos de tamaño conocido que se incluía en cada electroforesis. La resolución de los geles de agarosa utilizados no permitía diferenciar alelos de tamaño similar, es decir, con número de repeticiones muy próximo entre ellos. Esto obligaba a incluir en una misma electroforesis las muestras de un mismo caso para realizar la comparación, ya que, para una misma muestra podían estimarse tamaños diferentes si se analizaban en geles diferentes. Incluso la estimación del tamaño de los alelos de una misma muestra podía variar si la muestra era incluida en más de una calle en la misma electroforesis. Esto también representaba un obstáculo para la estandarización de la metodología y comparación de resultados entre laboratorios. A pesar de ello fue posible establecer bases de datos de frecuencias poblacionales (por ejemplo, referencias[14-15]) para los alelos de los diferentes marcadores utilizando diferentes enfoques estadísticos[16-18] para agrupar los alelos dentro de un rango de tamaños determinado, obteniendo de esta manera los datos necesarios para poder realizar la valoración estadística de las pruebas. Utilizando unas 4 a 6 SLP era posible alcanzar un poder de discriminación muy superior al que podía conseguirse con otros métodos disponibles. Sin embargo, a los problemas de reproducibilidad ya mencionados se sumaban los largos tiempos de análisis, la necesidad de contar con cantidades de muestra relativamente grandes y obtener ADN genómico de alto peso molecular. Esto último representaba una limitante para trabajar con muestras forenses de escasa cantidad o muestras con ADN degradado. A pesar de ello, el análisis de las SLP sería utilizado por unos cuantos años y se reemplazaría una vez que los sistemas de análisis por PCR se establecieran definitivamente en el campo de la genética forense.

En 1986 Mullis y colaboradores describen un método para amplificar *in vitro* regiones específicas del genoma[19]. El nuevo método se conoció como Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR. El sistema emula la replicación del ADN *in vivo*, solo que en lugar de utilizar los complejos enzimáticos celulares emplea diferentes temperaturas para separar las hebras de ADN (etapa de desnaturalización), para favorecer la hibridación posterior con oligonucleótidos específicos (etapa de anillamiento o hibridación), y para permitir la síntesis posterior (etapa de elongación) de una cadena de ADN complementaria utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable capaz de soportar los cambios de temperatura en cada ciclo. Repitiendo cíclicamente las etapas térmicas de desnaturalización-anillamiento-elongación se logra amplificar de manera exponencial cualquier región del genoma que se desee. La especificidad de la región que se amplifica está dada por un par de fragmentos sintéticos de ADN llamados *primers,* que se incluyen en la mezcla de reacción

y que por complementariedad con secuencias ubicadas en zonas flanqueantes a la región de interés funcionan como punto de partida para que la polimerasa comience a sintetizar una molécula de ADN. Los fragmentos amplificados tendrán la longitud de la secuencia comprendida entre la zona de anillamiento de los *primers* utilizados. La PCR crearía una verdadera revolución en los métodos de análisis de biología molecular en diferentes áreas de investigación y la genética forense también se beneficiaría rápidamente de este adelanto.

La aplicación de la PCR en genética forense permitió que los laboratorios pudiesen comenzar a trabajar con cantidades de muestras cada vez más pequeñas. Hoy resulta posible obtener el perfil genético de una persona con tan solo unas pocas células –técnicamente a partir de una única célula–, cantidad que podría encontrarse por ejemplo, en los restos de saliva depositados sobre una colilla de un cigarrillo. Si bien con esta herramienta las mayores ventajas pueden haberse logrado en los estudios de casos forenses, en donde por lo general el contenido de material biológico de las evidencias puede ser ínfimo –un pelo, una colilla de cigarrillo, una mancha diminuta de sangre o de semen, etc.–, los estudios de paternidad también se beneficiaron en varios aspectos. La posibilidad de analizar materiales biológicos que hasta entonces resultaba imposible o, que en la mayoría de los casos fracasaban, permitió que pudiesen realizarse estudios de paternidad *post mortem* analizando restos cadavéricos, la identificación de personas desaparecidas y estudios prenatales a partir de muestras mínimas de tejidos fetales, por mencionar algunos. Asimismo, fue posible aumentar la capacidad de análisis estudiando varios marcadores en forma simultánea, reduciendo de esa forma los tiempos de procesamiento y permitiendo incrementar el grado de certeza de los estudios.

En 1988 se usó por primera vez la PCR en genética forense en un caso de identificación de restos óseos, para analizar en esa oportunidad el *locus* HLA-DQ alfa[20]. La aplicación de este marcador se difundió entre los laboratorios forenses pero presentaba la desventaja de poseer un escaso poder de discriminación debido al bajo número de alelos presentes, por lo que rápidamente se intentaron buscar polimorfismos alternativos. Los *loci* minisatélites analizados por RFLP-SLP hasta ese momento poseían alelos con fragmentos de tamaños muy grandes (5-10 kb) por lo que no eran muy buenos candidatos para ser analizados por PCR, sobre todo si se pretendía trabajar con muestras críticas o degradadas. El análisis del minisatélite D1S80, cuyos alelos eran de tamaño inferior a 1 kb, se aplicó en los laboratorios forenses a principios de la década de 1990[21]. Metodológicamente implicaba la amplificación de ese *locus* por PCR y la detección posterior mediante tinción con nitrato de plata de los fragmentos de PCR separados por electroforesis en geles de poliacrilamida. Por esos mismos años se comenzaron a caracterizar regiones repetitivas del genoma cuya unidad de repetición está comprendida entre 2 y 7 nucleótidos, es decir, mucho más pequeñas que las unidades de repetición de los VNTR. Además, el número de repeticiones en estas regiones es menor que en los VNTR, por lo que los alelos de estos *loci* resultan de tamaño significativamente menor y por lo tanto más aptos para ser analizados por PCR. Estas regiones repetitivas son llamadas microsatélites, o repeticiones cortas en tándem, o más co-

múnmente STR, de su nombre en inglés *Short Tándem Repeat*s. Durante los años siguientes un número considerable de STRs de cromosomas autosómicos y de cromosomas sexuales fueron explorados para ser aplicados en identificación humana (por ejemplo, referencias[22-27]) y sobre la base de criterios bien establecidos[28] se seleccionaron distintos STR que hoy son ampliamente utilizados por la mayoría de los laboratorios. Un catálogo exhaustivo de los STR de uso común en genética forense completamente caracterizados puede encontrarse online en *STRbase*[29].

La adopción general de los STR como polimorfismos de análisis en los laboratorios de genética forense no dependió solo de su descubrimiento y de las ventajas estructurales que presentan estos marcadores sino que también se dio por una evolución rápida en las técnicas de análisis. Los primeros STR eran amplificados individualmente. Luego los fragmentos de amplificación eran separados en relación a su tamaño en geles de secuenciación de poliacrilamida que al ser teñidos con nitrato de plata revelaban la posición de los fragmentos. Rápidamente aparecieron "multiplexes" de STR que combinaban la amplificación simultánea de tres o cuatro STR en una misma reacción[30]. Para esto era necesario asegurarse que el diseño de los *primers* produciría fragmentos dentro de diferentes rangos de longitud para cada marcador, de manera que los mismos fueran identificados sin problemas al ser incluidos en una misma calle en una electroforesis. Además de los STR autosómicos se comenzó a incluir *primers* para amplificar una región del gen de la Amelogenina. Este gen se localiza en los cromosomas sexuales X e Y, presentando una deleción de 6 pares de bases en el cromosoma X, por lo que la amplificación de esta zona da como producto dos fragmentos con una diferencia de 6 pares de bases en los varones, y un único fragmento en las mujeres correspondiente al fragmento de menor tamaño derivado del cromosoma X[31]. La inclusión de la Amelogenina permitió desde entonces determinar el sexo de la muestra y se utiliza con este fin en la mayoría de los kits comerciales en la actualidad. La aparición de sistemas de detección automáticos para secuenciación, primero con geles y luego mediante electroforesis capilar, permitió subir un escalón más. Estos sistemas incorporaron la detección de fragmentos por fluorescencia en la electroforesis, de modo que se aumentó la capacidad de multiplexado marcando con fluorocromos diferentes los *primers* de los *loci* que dan fragmentos en rangos de tamaños superpuestos. Los primeros equipos de electroforesis capilar constaban de un único capilar; luego aparecieron equipos con arreglos de 4, 8, 16 y más capilares. De esta forma se gana en tiempo de análisis, poder de discriminación y, además, al poder analizar varios STR en una única reacción de PCR se reduce el volumen de muestra necesario para analizar, hecho que representa una ventaja importante para el análisis de muestras críticas. Las casas comerciales proveedores de insumos forenses acompañaron a los desarrollos de los grupos de investigación y diversos kits con combinaciones diferentes de STR fueron puestos a disposición de los laboratorios. Hoy es común utilizar kits en formato multiplex con 20 a 30 STR. El rediseño de los *primers* para obtener fragmentos más pequeños a fin de optimizar la amplificación de muestras con ADN degradado, la mejora en los búferes de reacción, el descubrimiento de nuevas polimerasas, han

demostrado una mejora notable en la performance de los kits de STR desde sus comienzos hasta la actualidad.

La factibilidad y practicidad que han demostrado el uso de los STR en cuanto a estandarización, automatización, análisis simultáneo de múltiples marcadores, creación de programas de control de calidad, capacidad para analizar muestras mínimas o en estado subóptimo, entre otras ventajas, han hecho que se consoliden como el tipo de polimorfismo de elección por la comunidad científica internacional en la investigación de parentesco y criminal. En la actualidad existen cientos de miles de publicaciones con datos de marcadores STR para diferentes poblaciones del mundo que resultan necesarios para la correcta interpretación estadística de los resultados.

Con los sistemas de detección fluorescente se ha incrementado notablemente la sensibilidad, haciendo posible la detección de cantidades de ADN mínimas en muestras puras y en mezclas de fluidos o tejidos. Esto mismo ha obligado a los laboratorios a establecer pautas de trabajo estrictas para minimizar problemas de contaminación. A su vez, con los programas informáticos utilizados para adquisición y análisis de datos se obtiene mayor cantidad de información que puede ser tenida en cuenta en la interpretación de los resultados, como por ejemplo estimación de las proporciones de los componentes de una mezcla a través del análisis de las alturas o áreas debajo de la curva de los picos de los electroferogramas. Esto ha llevado a nuevos trabajos colaborativos destinados a explorar estos temas (por ejemplo referencia[32]) y a la elaboración de guías y recomendaciones para la interpretación de los resultados (por ejemplo referencia[33]) y valoración estadística utilizando métodos que permiten utilizar más eficientemente la información obtenida del perfil genético (por ejemplo referencias[34-36]).

Una herramienta de valor para la justicia surgida a partir del uso de los STR son las bases de datos de ADN de uso forense. Estas bases de datos se han creado y han crecido en el tiempo con datos provenientes del análisis de marcadores STRs. La primera base de datos de ADN de uso forense en el mundo fue establecida en Inglaterra y Gales en 1995, conocida como *UK National DNA Database* (NDNAD). Inicialmente la NDNAD se generó sobre perfiles obtenidos para 6 marcadores STR y posteriormente fue expandida a un conjunto de 10 STR. Luego, con los proyectos de creación de bases de datos europeas, el número de marcadores ha sido expandido nuevamente. En los Estados Unidos el sistema fue introducido gradualmente desde 1989. En 1994 fue oficialmente creada y lanzada nacionalmente en 1998 con nueve estados participantes en ese momento. Actualmente todos los estados contribuyen a la base de datos, la cual se halla estructurada en tres niveles: local (LDIS), estatal (SDIS) y nacional (NDIS). Desde las iniciativas del Reino Unido y Estados Unidos, muchos países se han sumado a la implementación de bases de datos de ADN de interés forense. Según la encuesta de 2008 de INTERPOL entre 188 países miembros, 54 de ellos poseían en ese momento bases de datos de ADN, conteniendo en total más de 16 millones de perfiles genéticos correspondientes a muestras dubitadas y muestras de referencia[37]. En 2010, en Estados Unidos se han aplicado algoritmos de búsquedas familiares en bases de datos de uso criminal en la investigación de

delitos seriales que han permitido identificar al responsable de esos crímenes[38]. Muy recientemente, también en Estados Unidos, se han utilizado bases de datos de ADN públicas construidas con fines genealógicos para esclarecer un caso de violaciones seriales[39]. No obstante, el éxito de estas estrategias en los resultados de la investigación, la utilización de datos familiares o de muestras que han sido obtenidas con otro fin en las investigaciones criminales ha generado cierta controversia desde el punto de vista ético[40] que será materia de intenso debate en el futuro.

Debido a su modo de herencia biparental, los STR de cromosomas autosómicos son los de más amplia aplicación en la casuística forense. Sin embargo, dadas las propiedades de transmisión genéticas únicas que presentan los cromosomas sexuales X e Y, constituyen una herramienta muy importante en identificación genética en determinadas situaciones.

En el caso del cromosoma Y, los marcadores genéticos empleados en identificación humana se localizan en la porción no recombinante de este cromosoma, siendo transmitidos como haplotipos sin proveer variabilidad generación tras generación a través de ese proceso. El único mecanismo de variación en el tiempo entre los varones de un mismo linaje paterno está dado por la ocurrencia de mutaciones. La misma característica que confiere interés a los marcadores del cromosoma Y con fines de identificación humana, hace que su uso sea restringido solo a ciertas situaciones. Su utilidad reside fundamentalmente en la investigación de casos incompletos de investigación de paternidad con hijos varones, en la identificación de víctimas de catástrofes y personas desaparecidas, y en casos forenses en los cuales se sospecha la contribución de uno o más varones a la composición del patrón genético de una evidencia[41], principalmente en los casos de delitos sexuales en los que es frecuente obtener muestras biológicas de la víctima donde la presencia del componente femenino puede estar representado en una proporción altamente superior al componente masculino. En estos casos es común que exista una detección preferencial del componente femenino de la víctima en el análisis de marcadores autosómicos, enmascarando el perfil genético masculino. Esto no sucede en el análisis de marcadores del cromosoma Y, puesto que el mismo proviene solamente de la contribución masculina y el componente femenino no interfiere.

Más recientemente se ha valorizado el análisis de los STR del cromosoma X[42-44], que pueden resultar de interés en casos con ciertas constelaciones de individuos y en casos en los cuales el poder de exclusión de los marcadores autosómicos puede resultar disminuido.

El análisis de ADN mitocondrial se ha introducido en forense hacia finales de la década de 1990[45]. Debido al número de copias múltiples de ADN mitocondrial en cada célula y por ser una molécula pequeña resulta especialmente atractivo para el análisis de muestras difíciles, sobre todo cuando el análisis de marcadores nucleares no resulta factible. Asimismo, debido al tipo de herencia exclusivamente materna, ha demostrado ser una herramienta muy útil en la investigación de linajes por esta vía, sobre todo en ausencia de individuos de una o más generaciones (por ejemplo, referencia[46]).

Además de los STR, otros tipos de polimorfismos han sido incorporados en los análisis en genética forense. El Proyecto Genoma Humano y otros proyectos surgidos a partir del mismo han revelado la existencia de polimorfismos bialélicos presentes con una densidad muy alta a lo largo de todo el genoma. Estos polimorfismos son conocidos como polimorfismos de un único nucleótido o SNP (de *Single Nucleotide Polymorphism*). La abundancia de estos *loci* dispersos en el genoma de un individuo, y la capacidad de análisis a alta escala han despertado el interés por estos marcadores en estudios de identificación[47-50]. Comparados con los STR, individualmente poseen menor poder de discriminación, pero la capacidad de multiplexado permite el análisis simultáneo de gran número de SNP para alcanzar un poder de discriminación similar al logrado con los kits de STR. Además, la posibilidad de amplificar las zonas de polimorfismo en fragmentos de PCR muy pequeños, ha permitido su utilización en la identificación exitosa de muestras severamente degradadas[51,52]. Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a su utilización como herramienta exclusiva con esa finalidad en reemplazo de los STR[53-55]. Más recientemente se han desarrollado paneles con polimorfismos bialélicos de inserción/deleción o InDel[56,57]. Dado que se trata de polimorfismos de longitud cuyos alelos se diferencian por la presencia o ausencia de una secuencia de unos pocos nucleótidos, pueden ser analizados utilizando la misma metodología de análisis de los STR, siendo posible también su utilización exitosa en muestras difíciles debido a la posibilidad de obtener amplicones de pequeña longitud[58].

También ha sido posible caracterizar SNP e InDel cuyos alelos presentan frecuencias alélicas divergentes entre poblaciones ancestralmente o geográficamente distantes con el fin estimar el origen biogeográfico de muestras forenses[59-61]. El uso de paneles de estos marcadores resulta de utilidad para orientar investigaciones complejas en las que no se cuenta con individuos sospechosos de ser los donantes de esas evidencias[62]. En sentido similar, algunos grupos de investigación han venido trabajando en lo que se conoce como fenotipifación forense de ADN o *forensic DNA phenotyping* a través del desarrollo de paneles de marcadores con capacidad para predecir características fenotípicas de las personas como el color ojos, de pelo, de piel, la morfología facial, entre otros[63, 64]. A diferencia de los marcadores seleccionados para identificación, los marcadores utilizados para fenotipificación se localizan en las regiones codificantes o en regiones próximas a los genes que codifican para una determinada característica. La introducción del análisis de estos marcadores en genética forense lleva a un cambio que genera desafíos éticos y legales que deberán considerarse para regular una correcta utilización de marcadores de ADN fenotípicos, y ya hay países que han comenzado a legislar en este sentido[65].

Un aspecto de la investigación forense que también se ha beneficiado a partir de estudios más recientes es la posibilidad de identificar el tipo de fluido o tejido presente en una evidencia a partir del uso de técnicas de biología molecular. El análisis de marcadores de ARN mensajero como medio de identificar el tipo celular se ha propuesto hace un tiempo como reemplazo de los métodos tradicionales

de identificación de fluidos y tejidos[66]. Durante estos años se exploraron varios métodos con el fin de determinar marcadores específicos para diferentes tejidos (por ejemplo referencias[67-70]). Asimismo, el análisis de marcadores de metilación de ADN introducido en forense hace unos años para determinar el origen parental de los alelos de un individuo[71] ha sido utilizado posteriormente en la investigación del tipo de tejido (por ejemplo referencias[72,73]) y como método de estimación de la edad biológica del posible donante de una muestra (por ejemplo referencias[74,75]). El grupo EDNAP (*European DNA Profiling*) ha realizado una serie de ejercicios colaborativos en los que se han evaluado diferentes estrategias sobre diferentes muestras, tipos de tejidos, marcadores y metodología de análisis[76-80] y muy recientemente, también se ha evaluado la utilización de algunas plataformas de secuenciación masiva en paralelo para análisis de ARN mensajero para identificación de fluidos[81], demostrando el interés cada vez mayor de los laboratorios en la realización de este tipo de análisis. En el Capítulo 11 se abordan en detalle todos los aspectos del análisis de marcadores fenotípicos.

En algunos casos, la investigación criminal también puede requerir el análisis de muestras de origen no humano. Tal como se podrá leer más adelante en este libro, se trata de un área con mucho tiempo de existencia dentro de la genética forense pero que ha ido adquiriendo relevancia durante los últimos años debido a mayor difusión del conocimiento en el tema y a nuevas herramientas de análisis disponibles.

Finalmente, los nuevos desarrollos tecnológicos surgidos con las nuevas plataformas de secuenciación masiva en paralelo, llamadas también MPS (*Massive Parallell Sequencing*) o NGS (*Next Generation Sequencing*) están teniendo aplicación cada vez más intensa en genética forense. Desde la primera aplicación para secuenciación de ADN mitocondrial en forense[82], diferentes estrategias se han comenzado a implementar y comercializar que permiten en algunos casos combinar el análisis simultáneo de marcadores genéticos de diferente tipo aplicables a identificación, estimación de ancestralidad, investigación de linajes específicos, etc., reduciendo tiempo de análisis y ofreciendo un espectro de resultados que puede abarcar diferentes aspectos de interés de los que hemos comentado.

Como ocurre en todas las ramas de la ciencia, los avances en genética forense han sido posibles gracias a una amplia colaboración internacional que involucra investigadores de muchos países. Es así que han surgido diferentes grupos de trabajo con la el objetivo común de difundir los nuevos conocimientos en la materia y establecer pautas para la utilización de estas metodologías. La evolución de las pruebas biológicas y su relación temporal con hechos científicos relevantes y la creación de algunos de los grupos de estandarización que se comentan a continuación se halla representada en la línea de tiempo de la Figura 1.1.

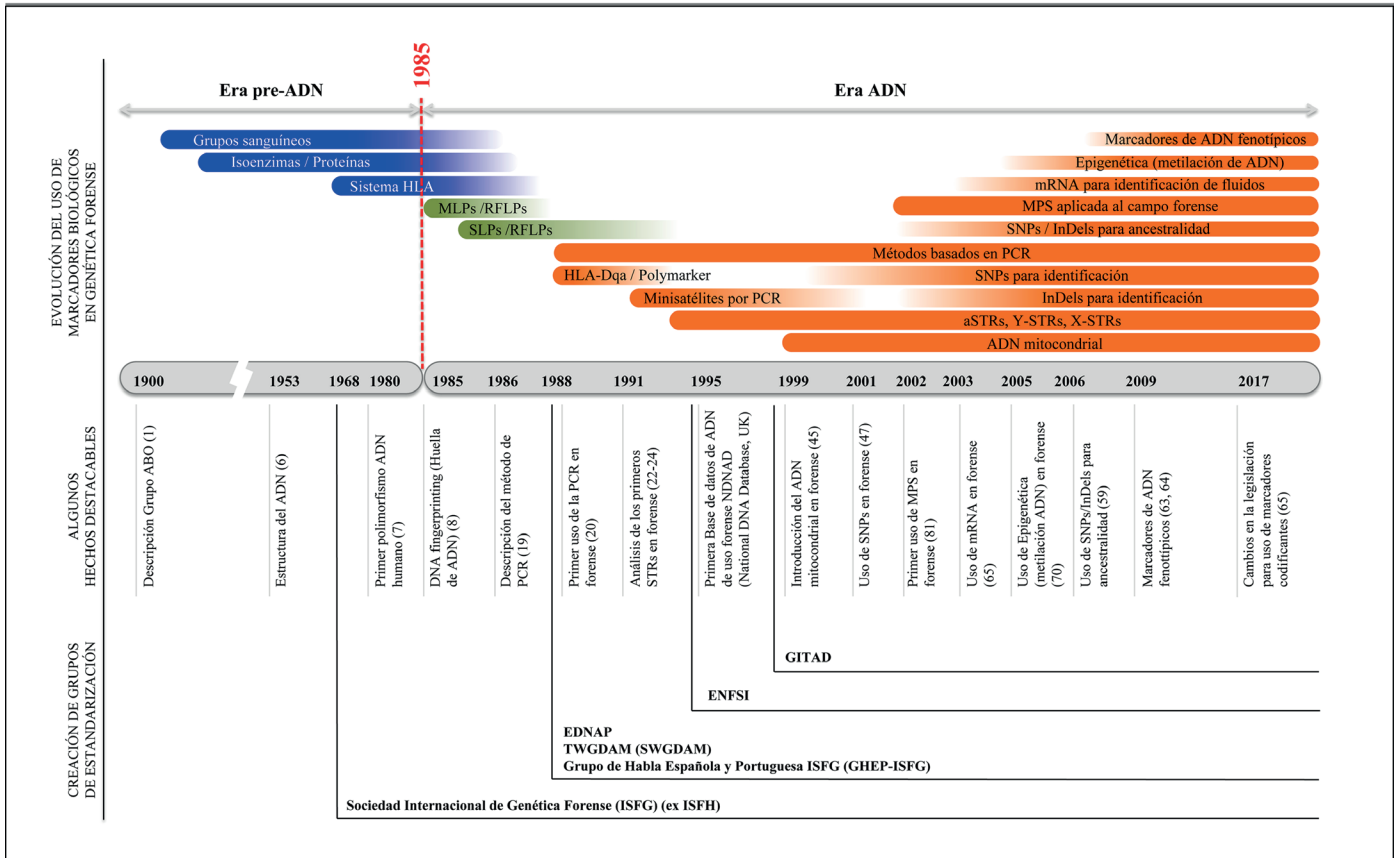

Figura 1.1. Evolución de las pruebas biológica de uso en genética forense y relación cronológica con algunos hitos científicos importantes y la creación de grupos de estandarización (véase texto principal para las siglas). Las principales referencias bibliográficas aparecen entre paréntesis.

1.3. GRUPOS DE ESTANDARIZACIÓN

Existen diversas organizaciones que reúnen expertos en genética forense. Internacionalmente, el grupo de trabajo más importantes en el campo está representado por la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG), que cuenta a la fecha con unos 1.200 miembros de 60 países expertos en genética molecular, serología de grupos sanguíneos, matemática, estadística, como así también especialistas en bioética y del ámbito jurídico (http://www.isfg.org). Esta sociedad fue creada en 1968 en Alemania con el nombre de Sociedad de Hemogenética Forense debido a que por aquel entonces las pruebas biológicas disponibles aplicadas a estudios de paternidad y de manchas forenses se basaban en el análisis de polimorfismos de grupos sanguíneos. Rápidamente la sociedad se transformó en una sociedad internacional y en 1980 se cambió el nombre a Sociedad Internacional de Hemogenética Forense (ISFH). Finalmente, luego de la introducción de los métodos de análisis de ADN en genética forense terminaría por reemplazarse el término "Hemogenética" por el de "Genética" para adoptar el nombre actual de ISFG que refleja más adecuadamente el uso de los nuevos métodos de análisis, ya que los mismos son aplicables no solo a muestras de sangre sino a cualquier tipo de tejido y fluido biológico a partir del cual pueda obtenerse y analizarse su ADN.

La ISFG organiza regularmente diversas actividades académicas y científicas, destacándose la realización en forma bienal del congreso internacional de la ISFG y las reuniones regionales de sus grupos de trabajo. Además, desde el año 2007 la sociedad posee su propia publicación científica llamada *Forensic Science International: Genetics* (*FSI: Genetics*) dedicada exclusivamente a la difusión de trabajos de investigación en el campo de la genética forense y de acceso libre para todos los miembros de la sociedad.

La ISFG ha cumplido un papel crucial en estandarización del trabajo derivado de los estudios en marcadores genéticos. En 1987 se creó la Comisión de ADN (*DNA Commission*) con el fin de discutir la aplicación de los nuevos desarrollos en el contexto médico-legal y crear recomendaciones al respecto, las cuales se encuentran publicadas y pueden ser consultadas en el sitio web de la sociedad[83].

Además, la ISFG nuclea diversos grupos de trabajo regionales u organizados por el uso de una lengua común en diferentes países, a través de los cuales se ha logrado un importante espacio para el intercambio de información y el tratamiento de temas específicos a nivel local o regional.

En Europa el grupo EDNAP (*European DNA Profiling Group*) ha tenido un protagonismo principal en la armonización de procedimientos de laboratorio a fin de establecer estándares de uso comunes en los diferentes países del continente (https://www.isfg.org/EDNAP). El grupo tuvo su origen en octubre de1988 en Inglaterra, en Sunbury, en donde se reunieron por primera vez científicos, académicos y representantes de compañías dedicadas a la comercialización de productos para análisis de ADN. El objetivo principal era establecer un sistema que permitiera la comparación de datos de ADN para poder cruzar las investigaciones de delitos ocurridos en distintas naciones. En 1991, EDNAP fue aceptado como grupo

de trabajo de ISFG, con la intención de que cada país de Europa sea representado por un laboratorio con experiencia demostrada en genética forense. Desde su fundación, EDNAP ha mantenido reuniones periódicas una o dos veces al año para discutir tópicos de interés específicos y programar sus actividades. La coordinación de ejercicios colaborativos sobre distintos temas entre los laboratorios participantes ha sido una de las actividades principales del grupo y la publicación de los resultados de los ejercicios, listados en el sitio web de EDNAP, ha brindado a muchos laboratorios las herramientas para adoptar las metodologías de análisis y marcadores apropiados. Los primeros ejercicios colaborativos estaban enfocados en el uso de las SLP. Luego, con la aparición de la PCR y la tendencia a la automatización en las metodologías de detección, los ejercicios se centraron en el análisis de las STR por los laboratorios participantes, con lo que se logró definir un set de marcadores llamado *European Standard Set of Loci* (ESS) que incluía los marcadores THO1, VWA, FGA y D21S11. Más adelante incorporarían el análisis de STRs de cromosoma Y como así también de polimorfismos de ADN mitocondrial. Desde 1999 ha perseguido el proyecto EMPOP (*EDNAP MtDNA population database*) que se encuentra disponible en internet desde octubre de 2006 (https://empop.online). Las actividades actuales están concentradas en la evaluación de las SNP de uso forense y en el análisis de ARN mensajero para la identificación de fluidos biológicos.

Desde 2004, el grupo EDNAP ha coordinado sus reuniones con las del Grupo de Trabajo en ADN de la Red Europea de Institutos de Ciencias Forenses (ENFSI) a fin de que los miembros de ambos grupos puedan participar de ambas reuniones intensificando de esa manera el intercambio de información. Trabajando conjuntamente han desarrollado recomendaciones para ampliar el "ESS" original con cinco nuevos marcadores STR.

ENFSI (http://enfsi.eu/) fue fundada en 1995 con el propósito de incrementar el intercambio de información en el campo de las ciencias forenses. Posee 17 grupos de trabajo en áreas específicas. El grupo de ADN de ENFSI cuenta en la actualidad con miembros de más de 50 organizaciones de 35 países europeos. El grupo de ADN se ha convertido en un espacio de entrenamiento a través de la realización periódica de seminarios y talleres para validación, introducción y mejora de los análisis de ADN en forense, abarcando todos los aspectos de los análisis. De manera particular, el grupo colabora con relación a la forma de interpretación e informe de resultados, considerando estrategias y elaborando recomendaciones para la presentación de la evidencia en las cortes. Dos veces al año se realizan reuniones, en las cuales además de las sesiones plenarias destinadas a actualización y discusión de tópicos de interés por parte de los miembros, se realizan talleres sobre temas específicos como interpretación de resultados, calidad, bases de datos, entre otros, cumpliendo de esta manera con su misión educativa.

De manera similar al grupo de ADN de ENFSI, el Grupo Científico de Trabajo en Métodos de Análisis de ADN conocido como "SWGDAM" (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) (https://www.swgdam.org) ha trabajado para establecer recomendaciones con fines de estandarización del trabajo de los laboratorios de genética forense en Estados Unidos y Canadá, y sirve como foro

de discusión y educación continua para mejorar la calidad de los servicios de biología forense. Está constituido por alrededor de 50 científicos de laboratorios locales, estatales y federales. El grupo fue creado en 1988 como "TWGDAM" (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*) y en 1998 se cambió la denominación a su nombre actual. Diferentes subcomités han funcionado a lo largo de la existencia de este grupo con el fin de proveer recomendaciones sobre distintos temas de interés. El primero de ellos fue formado a partir de la reunión fundacional para trabajar en la elaboración de guías de trabajo para los laboratorios que por aquél momento realizaban análisis de RFLP. Esas guías fueron publicadas en 1989[84]. A partir de allí, los siguientes subcomités se han enfocado en temas de interés a medida que nuevos desarrollos se han ido incorporando en el área: PCR, análisis de las STR, ADN mitocondrial y cromosoma Y, calidad, bases de datos, identificación de personas desaparecidas y víctimas de catástrofes, interpretación de mezclas, etc. El grupo mantiene dos reuniones anuales para sus miembros y también reuniones públicas que actualmente se llevan a cabo como parte de la Conferencia Nacional de CODIS.

En Iberoamérica, el primer grupo de trabajo y único integrante de la ISFG es el Grupo de Habla Española y Portuguesa de la ISFG, conocido como GHEP-ISFG (http://www.ghep-isfg.org), cuyo objetivo general es estimular la educación continua de sus miembros en el campo de la genética forense promoviendo diferentes tipos de actividades científicas y académicas. El grupo tuvo su origen en una reunión realizada en 1989 durante el 13º Congreso Internacional de la ISFG de la que participaron unos pocos expertos en genética forense de España y Portugal[85]. Como resultado de esa reunión surgió la necesidad de realizar un ejercicio colaborativo entre los laboratorios de esos países y evaluar los resultados del intercambio[86]. Este primer ejercicio despertaría el interés de otros laboratorios y a partir de 1992 el ejercicio empezaría a realizarse anualmente de manera ininterrumpida adquiriendo un papel vital en el desarrollo del grupo. En los años siguientes, el ejercicio trascendería las fronteras de Europa y un número creciente de laboratorios de América Latina comenzarían también a participar en el mismo. Desde el primer ejercicio el Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses (INTCF) de Madrid ha colaborado con el GHEP-ISFG en su organización y a raíz de esta cooperación histórica la coordinación anual ha sido delegada en el Departamento de Calidad del INCTF. Desde 2014 el Ejercicio de Intercomparación en su nivel básico se encuentra acreditado bajo la Norma ISO/IEC 17043:2010.

En la actualidad, el GHEP-ISFG mantiene un número de alrededor de 300 integrantes de unos 150 laboratorios públicos y privados de más de 22 países. El crecimiento del grupo ha derivado en un intercambio de conocimiento que ha expuesto la necesidad de formación en temas específicos de genética forense. En ese sentido, el GHEP-ISFG organiza una reunión anual llamada Jornadas de Genética Forense, que cuando resulta posible se realiza en forma conjunta con el congreso de ISFG. Durante las jornadas se discuten los resultados del Ejercicio de Intercomparación de ese año y se realizan eventualmente talleres sobre temas específicos. Además de estas actividades el grupo posee Comisiones de Trabajo

para tratar temas específicos. A través de ellas, el grupo ha producido recomendaciones en diferentes tópicos de interés y se han publicado más de 30 artículos originales en revistas científicas, a los que es posible acceder desde el sitio web del GHEP-ISFG (https://ghep-isfg.org/publications/).

Años después de la fundación del GHEP-ISFG, se crearon nuevos grupos y asociaciones que, por fuera del ámbito de la ISFG, han contribuido igualmente a la formación de recursos y estandarización en España, Portugal y Latinoamérica.

El Grupo Iberoamericano de Trabajo en Análisis de ADN (GITAD) fue creado en noviembre de 1997 con el fin de abordar problemas comunes en los análisis de ADN en la mayoría de los países de América Latina[87]. El grupo incluyó el término de "Iberoamericano" para destacar también la inclusión de miembros de España y Portugal. En 1998 el GITAD organizó su primera reunión durante el 9º Simposio Internacional de Identificación Humana, en Lake Buena Vista (FL, USA), del cual participaron representantes de once países. El GITAD fue creado para intentar coordinar los esfuerzos de la comunidad de genetistas forenses en Iberoamérica para facilitar la comunicación e intercambio de conocimiento técnico y experiencias y mejorar la calidad de los análisis en los países participantes. El GITAD forma parte de la Academia Iberoamericana de Criminalística y Estudios Forenses (AICEF) junto a grupos de trabajo en otras disciplinas forenses. El grupo mantiene reuniones periódicas de sus miembros y organiza también un ejercicio de control de calidad. A partir de 2006, luego de un Simposio de AICEF e INPALMS (*Indo-Pacific Association of Law, Medicine and Science*) el ejercicio se ha expandido y ha incorporado la participación de países asiáticos y también Australia.

■ CONCLUSIÓN

En unas tres décadas la utilización del análisis del ADN ha revolucionado la historia de la genética forense. En este período, relativamente breve, los conocimientos surgidos a partir de las investigaciones en genómica y biología molecular y los adelantos tecnológicos han permitido alcanzar niveles de estandarización elevados y mejorar la calidad de los análisis. Los cambios han impactado en diversas áreas de trabajo que forman parte de esta disciplina. Técnicamente se ha conseguido un grado de homogeneidad aceptable en los laboratorios del mundo en cuanto a metodologías de análisis y tipos de marcadores de ADN utilizados en los estudios convencionales de identificación. Los desarrollos incorporados han permitido superar dificultades técnicas en lo que respecta al análisis de muestras límites, degradadas o inhibidas. Además, la unificación de criterios de análisis ha posibilitado el desarrollo de programas de control de calidad y el intercambio de datos entre laboratorios. En cuanto a los sistemas de justicia, eso se ha reflejado también en la implementación de bases de datos de ADN de uso forense en diferentes países, que a través del establecimiento de pautas comunes admiten la comparación de datos de manera local, regional e internacional. La factibilidad de obtener mayor información del análisis de los perfiles genéticos y su uso posterior en la interpretación de resultados de muestras con perfiles mezcla

o con perfiles incompletos ha hecho que esta etapa del proceso adquiera mayor complejidad en ciertas situaciones, requiriendo del diseño de nuevos modelos estadísticos-matemáticos y de asistencia con herramientas informáticas específicas para una valoración más eficiente y justa de la evidencia genética. Las nuevas plataformas basadas en secuenciación masiva en paralelo, que están siendo incorporadas por los laboratorios del mundo de manera creciente, demandarán nuevas tareas de estandarización en aspectos técnicos, en el análisis de datos y en el establecimiento de criterios de nomenclatura para los sistemas utilizados. Los marcadores fenotípicos representan un atractivo muy interesante como complemento en casos puntuales de investigación criminal. Sin embargo, la utilización de este tipo de marcadores, ubicados en zonas codificantes del genoma, enfrenta dilemas éticos y legales que deberán ser resueltos para evitar el uso indebido de la información que arrojen estos estudios.

Como vemos, la evolución de los análisis de ADN en genética forense ha seguido una cinética muy veloz. Los grupos de trabajo en estandarización han cumplido un rol central en la implementación de los avances científicos y en la armonización de protocolos en los laboratorios. Nuevos progresos surgirán de manera constante y la comunidad de genetistas forenses deberá poseer la capacidad de aprovecharlos eficientemente. Para ello será necesario realizar los máximos esfuerzos en estimular la cooperación impulsando las actividades de grupos de trabajo en las distintas áreas de interés, priorizando como hasta ahora las actividades de formación y difusión de conocimiento. De esta forma será posible continuar aportando al progreso de nuestra ciencia y a través de ello a mejorar la vida de las personas y las sociedades.

■ REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Landsteiner K. Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschilchen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 1901; 14:1132–1134.
2. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*. 1958; 20:156–66.
3. van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*. 1958; 181:1735–6.
4. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest*. 1958; 37:1756–62.
5. Hershey A, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*. 1952; 36:39–56.
6. Watson JD, Crick FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953; 171:737–738.
7. Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77:6754–6758.
8. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual–specific fingerprints of human DNA. *Nature*. 1985; 316:76–79.
9. Weller P, Jeffreys AJ, Wilson V, Blanchetot A. Organization of the human myoglobin gene. *The EMBO Journal*. 1984; 3:439–446.

10. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology.* 1975; 98:503-517.
11. Jeffreys AJ, Brookfield JFY and Semenoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. 1985; 317:818-819.
12. *The Guardian*. [acceso junio de 2018]. Disponible en: https://www.theguardian.com/uk-news/2016/jun/07/killer-dna-evidence-genetic-profiling-criminal-investigation
13. Nakamura Y, Leppert M, O'Connel P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C *et al.* Variable number of tandem repeat markers for human gene mapping. *Science*. 1987; 235:1616–1622.
14. Balazs I, Baird M, Clyne M, Meade E. Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci. *Am J Hum Genet*. 1989; 44:182–190.
15. Budowle B, Monson KL, Giusti AM, Brown BL. The assessment of frequency estimates of Hae III-generated VNTR profiles in various reference databases. *J Forensic Sci.* 1994; 39(2):319-52.
16. Budowle B, Giusti AM, Waye JS, Baechtel FS, Fourney RM, Adams DE, Presley LA, Deadman HA and Monson KL. Fixed-Bin Analysis for Statistical Evaluation of Continuous Distributions of Allelic Data from VNTR Loci, for Use in Forensic Comparisons. *Am J Hum Genet*. 1991; 48:841-855.
17. Chakraborty R, Jin L, Zhong Y, Srinivasan MR, Budowle B. On allele frequency computation from DNA typing data. *Int J Legal Med.* 1993; 106(2):103-6.
18. Herrin GJr. A comparison of models used for calculation of RFLP pattern frequencies. *J Forensic Sci.* 1992; 37(6):1640-51.
19. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986; 1:263–273.
20. Blake E, Crim D, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh PS, Erlich H. Polymerase chain-reaction (PCR) amplification an human leukocyte antigen (HLA)-DQ-alpha oligonucleotide typing on biological evidence samples – casework experience. *Journal of Forensic Science*. 1992; 37:700–726.
21. Kasai K, Nakamura Y, White R. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic-science. *Journal of Forensic Science.* 1990; 35:1196–1200.
22. Edwards A, Civitello A, Hammond HA and Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* 1991; 49:746–756
23. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT and Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomic*. 1992; 12:241–253
24. Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, *et al*. Evaluation of Y–chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med.* 1997; 110:125–133.
25. Edelmann J, Hering S, Michael M, Lessig R, Deischel D, Meier–Sundhausen G, Roewer L, Plate I and Szibor R. 16 X–chromosome STR loci frequency data from a German population. *Forensic Sci Int.* 2001; 124:215–218

26. Gusmão L, Sánchez–Diz P, Alves C, *et al.* GEP–ISFG (The Spanish and Portuguese Working Group of the International Society for Forensic Genetics) Results of the GEP–ISFG collaborative study on the Y chromosome STRs GATA A10, GATA C4, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS439, DYS460 and DYS461: population data. *Forensic Sci Int.* 2003; 135:150–157.
27. Butler J. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci.* 2006; 51:253–265
28. Carracedo A, Lareu MV. Development of New STRs for Forensic Casework: Criteria for Selection, Sequencing & Population Data and Forensic Validation. *Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification,* 1998; pp. 89–107. Madison, Wisconsin: Promega Corporation.
29. National Institute of Standards and Technology. U.S. Department of Commerce. Short Tandem Repeat DNA Internet Database. [acceso junio de 2018]. Disponible en: https://strbase.nist.gov
30. Kimpton C, Fisher D, Watson S, *et al.* Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of 4 tetrameric STR loci. *Int J of Legal Med.* 1994; 106:302–311.
31. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test – fluorescence based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*. 1993; 15: 636–638.
32. Barrio PA, Crespillo M, Luque JA, *et al.* GHEP-ISFG collaborative exercise on mixture profiles (GHEP-MIX06). Reporting conclusions: Results and evaluation. *Forensic Sci Int Genet.* 2018; 35:156–163.
33. Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, Prieto L,Prinz M, Schneider H, Schneider PM, Weir BS. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6:679–688.
34. Haned H, Egeland T, Pontier D, Pène L, Gill P. Estimating drop-out probabilities in forensic DNA samples: A simulation approach to evaluate different models. *Forensic Sci Int Genet.* 2011; 5:525–531.
35. Gill P, Haned H. A new methodological framework to interpret complex DNA profiles using likelihood ratios. *Forensic Sci Int Genet*. 2013; 7:251–263.
36. Bleka Ø, Benschop C, Storvik G, Gill P. A comparative study of qualitative and quantitative models used to interpret complex STR DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet.* 2016; 25:85–96.
37. Interpol Handbook on DNA Data Exchange and Practice. *Reccomendations From the Interpol DNA Monitoring Expert Group*. Second Edition. 2009.
38. Myers SP, Timken MD, Piucci ML, Sims GA, Greenwald MA, Weigand JJ, Konzak KC, Buoncristiani MR. Searching for first-degree familial relationship in California's offender DNA database: validation of a likelihood ratio-based approach. *Forensic Sci Int Genet.* 2011; 5(5):493–500.
39. The Sacramento Bee. 2018. [acceso junio de 2018]. Disponible en: https://www.sacbee.com/news/local/crime/article209913514.html
40. Editorial. The ethics of catching criminals using their family's DNA. *Nature*. 2018; 557:5.

41. Prinz M, Ishii A, Coleman A, Baum HJ, Shaler RC. Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. *Forensic Sci Int.* 2001; 120:177–188.
42. Szibor R, Edelmann J, Hering S, Plate I, Wittig H, Roewer L, Wiegand P, Calì F, Romano V, Michael M. *Forensic Sci Int.* 2003; 138:37–43.
43. Ayres KL, Powley WM. Calculating the exclusion probability and paternity index for X–chromosomal loci in the presence of substructure. *Forensic Sci Int*. 2005; 149:201–203
44. Gusmão L, Sánchez-Diz P, Alves C, *et al.* A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Legal Med*. 2009; 123(3):227–34.
45. Holland MM, Parsons T. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.* 1999; 11:21–50.
46. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*. 1994; 6(2):130-5.
47. Gill P. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int J Legal Med*. 2001; 114: 204–210.
48. Budowle B, van Daal A. Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 2008; 44:603–608,610.
49. Freitas NS, Resque RL, Ribeiro–Rodrigues EM, Guerreiro JF, Santos NP, Ribeiro–Dos–Santos A and Santos S. X–linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33–markers panel. *Int J Legal Med* 2010; 124: 589–593.
50. Sánchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, *et al.* A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 2006; 27:1713–1724.
51. Fondevila M, Phillips C, Naveran N, Fernández L, Cerezo M, Salas A, Carracedo Á, Lareu MV. Identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. *Forensic Sci Int Genet.* 2008; 2:212–218.
52. Freire-Aradas A, Fondevila M, Kriegel AK, Phillips C, Gill P, Prieto L, Schneider P, Carracedo Á, Lareu MV. A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA. *Forensic Sci Int Genet*. 2012; 6:341–349.
53. Gill P, Werrett DJ, Budowle B and Guerrieri R. An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases—joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). *Sci Justice.* 2004; 44:51–53.
54. Amorim A, Pereira L. Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Sci Int.* 2005; 150:17–21.
55. Butler JM, Coble MD, Vallone PM. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol.* 2007 3:200–205.
56. Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo Á, Gusmão L. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis*. 2009, 30 (21):3682–3690.

57. Pereira R, Alves C, Aler M, Amorim A, Arevalo C, *et al.* A GHEP-ISFG collaborative study on the genetic variation of 38 autosomal T indels for human identification in different continental populations. *Forensic Sci Int Genet*. 2018; 32:18–25.
58. Romanini C, Catelli ML, Borosky A, Pereira R, Romero M, Salado Puerto M, Phillips C, Fondevila M, Freire A, Santos C, Carracedo Á, Lareu MV, Gusmão L, Vullo CM. Typing short amplicon binary polymorphisms: supplementary SNP and Indel genetic information in the analysis of highly degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(4): 469–476.
59. Phillips C, Salas A, Sánchez JJ, Fondevila M, Gómez-Tato A, *et al.* Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1:273–280.
60. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, Santos SEBd, *et al.* Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing. *PLoS ONE.* 2012; 7(1): e29684.
61. Phillips C. Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; 18:49–65.
62. Phillips C, Prieto L, Fondevila M, Salas A, Gómez-Tato A, *et al*. Ancestry analysis in the 11-M Madrid bomb attack investigation. *PLoS ONE*. 2009; 4:e6583.
63. Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: Motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3:154–161.
64. Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; 18:33–48.
65. Editorial. Forensics: Germany considers wider use of DNA evidence in criminal cases. *Nature*. 2017; 543:583–590.
66. Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int.* 2003; 135:85–96.
67. Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci. 2007*; 52:1252–1262.
68. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci*. 2008; 53:296–305.
69. Haas C, Klesser B, Maake C, Bär W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet.* 2009; 3:80–88.
70. Sakurada K, Akutsu T, Fukushima H, Watanabe K, Yoshino M. Detection of dermcidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA. *Forensic Sci Int*. 2010; 194:80–84.
71. Zhao G, Yang Q, *et al.* Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. *Forensic Sci Int.* 2005; 154:122–127.
72. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2011; 5:517–524.
73. Wasserstrom A, Frumkin D, Davidson A, Shpitzen M, Herman Y, Gafny R. Demonstration of DSI-semen – a novel D*NA methylation-based forensic semen identifica-*

tion assay. Forensic Sci Int Genet. 2013; 7:136–142.
74. Yi SH, Xu LC, Mei K, Yang RZ, Huang DX. Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic Sci Int Genet*. 2014; 11:117–25.
75. Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, *et al.* Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Sci Int Genet*. 2016; 24:65–74.
76. Haas C, Hanson E, Bär W, Banemann R, *et al.* mRNA profiling for the identification of blood – Results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2011; 5:21–26.
77. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, *et al.* RNA/DNA co-analysis from blood stains – Results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2012; 6:70–80.
78. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, *et al.* RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains – Results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2013; 7:230–239.
79. Haas C, Hanson E, Anjos MJ, *et al.* RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: Results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2014; 8:203–212.
80. Haas C, Hanson E, Banemann R, et al. RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces – results of a sixth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; 16: 139–47.
81. Ingold S, Dørum G, Hanson E, *et al.* Body fluid identification using a targeted mRNA massively parallel sequencing approach – results of a EUROFORGEN/EDNAP collaborative exercise. *Forensic Sci Int Genet*. 2018; 34:105–115.
82. Andreasson H, Asp A, *et al.* Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. *Biotechniques*. 2002; 32: 124–6.
83. Recommendations of the ISFG-DNA Commission. [acceso junio de 2018]. Disponible en: https://www.isfg.org/Publications/DNA+Commission
84. Guidelines for a Quality Assurance Program for DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Crime Laboratory Digest*. 1989; 16(2):261–278.
85. Alonso A, Albarrán C. *Profiles in DNA*, August 2000.
86. Gómez J, Carracedo A, The 1998–1999 collaborative exercises and proficiency testing program on DNA typing of the Spanish and Portuguese Working Group of the Interna- tional Society for Forensic Genetics (GEP-ISFG). *Forensic Sci Int*. 2000; 114:21–30.
87. Lorente JA. The GITAD Project: DNA Typing in Latin America. *Profiles in DNA* 1999; 3(1):8–9.