Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biología

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS DEL ADN ANTIGUO EN EL CONTEXTO DE LA MEMORIA DEMOCRÁTICA DE ANDALUCÍA

Alumno: María Isabel Medina Lozano

Julio, 2022

UNIVERSIDAD
DE JAÉN

Facultad de
Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS DEL ADN ANTIGUO EN EL CONTEXTO DE LA MEMORIA DEMOCRÁTICA DE ANDALUCÍA

MEDINA LOZANO MARIA ISABEL - 26499602Z

Firmado digitalmente por MEDINA LOZANO MARIA ISABEL - 26499602Z
Fecha: 2022.07.06 13:12:16 +02'00'

Alumno: María Isabel Medina Lozano

Jaén, Julio, 2022

Contenido

RESUMEN 4

ABSTRACT 4

ABREVIATURAS 5

1. INTRODUCCION 6

1.1 Genética Forense 6

1.2 El ADN y la identificación humana 7

1.3 Otros marcadores 10

1.4 Actualidad Genética Forense 14

1.5 Qué consideramos ADN antiguo 16

1.6 ADN en el Contexto Histórico-Actual de la Memoria Democrática 17

2. OBJETIVOS 21

3. MATERIALES Y MÉTODOS 22

3.1 Análisis de Muestras Dubitadas 22
3.1.1 Limpieza 24
3.1.2 Pulverización 25
3.1.3 Extracción y purificación del ADN 25
3.1.4 Cuantificación del ADN 27
3.1.5 Amplificación de ADN por Polymerase Chain Reaction (PCR) 29
3.1.6 Análisis de los datos por electroforesis capilar 30
3.1.7 Análisis estadístico 31

3.2 Análisis Muestras indubitadas o de Referencia 32
3.2.1 Pretratamiento de Muestras 32
3.2.2 Aislamiento de ADN 32
3.2.3 Cuantificación de ADN 33

4. RESULTADOS 34
4.1 Muestras Dubitadas 34
4.2 Muestras Indubitadas 37
4.3 Resultados de Identificación 38

5. DISCUSIÓN 43

6. CONCLUSIÓN 46

7. BIBLIOGRAFÍA 47

RESUMEN

El proceso de identificación genética partiendo de restos óseos antiguos y el consecuente grado de degradación presenta un gran reto para el campo de la Genética Forense. Los avances tecnológicos en este campo como la extracción automatizada o la NGS ha resuelto muchos de los problemas que podían presentarse para la obtención de resultados. Todo ello ha mejorado la obtención de resultados en referencia a la tarea de la identificación de las víctimas de la Guerra Civil y Posguerra Española, los cuales vamos a analizar en este trabajo, actualizando los resultados obtenidos hasta el momento. Se describe el proceso para obtención de estos resultados, desde su extracción hasta la obtención del perfil genético; aunque continuamente se están revisando. Este proyecto de investigación se está desarrollando en el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada gracias a la Ley de Memoria Democrática de 2007 y del Convenio de Colaboración entre la Junta de Andalucía y la Universidad de Granada. El objetivo de este proyecto de Laboratorio es identificar el mayor número posible de muestras dubitadas procedentes de la exhumación de fosas y relacionarlas con muestras de familiares.

ABSTRACT

The process of genetic identification based on ancient bone remains and the consequent degree of degradation presents a great challenge for the field of Forensic Genetics. Technological advances in this field, such as automated extraction or NGS, have solved many of the problems that could arise in obtaining results. All this has improved the obtaining of results in reference to the task of identifying the victims of the Spanish Civil War and Postwar, which we are going to analyze in this work, updating the results obtained up to now. The process for obtaining these results is described, from their extraction to obtaining the genetic profile; although they are continually being revised. This research project is being developed in the Genetic Identification Laboratory of the University of Granada thanks to the Democratic Memory Law of 2007 and the Collaboration Agreement between the Junta de Andalucía and the University of Granada. The objective of this Laboratory project is to identify the largest possible number of doubtful samples from the exhumation of graves and relate them to samples from relatives.

ABREVIATURAS

- ADN= Ácido Desoxirribonucléico
- ADNmt = ADN mitocondrial
- SNP = Sigle Nucleotide Repeat
- STR = Short Tandem Repeat
- MPS = Massive Parallel Sequencing
- HLA = Human Leukocyte Antigens o Antígenos de Leucocitos Humanos
- LR = Likehood Ratio o Razón de Verosimilitud
- RFU = relative fluorescence units o unidad de fluorescencia relativa
- Pb = pares de bases
- PCR = Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa
- qPCR o RT-PCR = PCR cuantitativa o PCR a tiempo real
- DTT = Ditiotreitol (agente reductor)
- SDS = Dodecilsulfato sódico (detergente aniónico)

1. INTRODUCCION

1.1 Genética Forense

En las últimas décadas, el uso del estudio genético con ADN para la identificación de individuos ha supuesto una de las mayores revoluciones en el campo de las Ciencias Forenses. Los métodos de ADN antiguo y ADN forense en muestras antiguas, pese a tener objetivos distintos, comparten la meta de obtener el máximo y mejor ADN posible (Hofreiter et al., 2021). Este estudio cobra especial importancia en personas desaparecidas, atentados terroristas, grandes catástrofes, fosas comunes de conflictos bélicos y litigios relacionados con la filiación o adopciones irregulares (Barrio-Caballero,2012). Las citas bibliográficas, ya sabes, o con este formato o con las referencias numéricas entre corchetes, pero no ambos.

El ADN aislado proveniente de restos óseos tiene la posibilidad de identificarlos *post-mortem* a través de análisis genéticos y comparándose con familiares de estos restos óseos. El estudio de este tipo de ADN proveniente de restos antiguos se encuentra rodeado de diversas dificultades, como son la conservación del ADN o la contaminación de las muestras.

La identificación genética o estudio genético se basa en el análisis de las diferentes regiones de variabilidad del genoma, STRs, que hacen posible la obtención de perfiles genéticos y la exclusión entre dos individuos de una misma especie. Para cada fragmento estudiado existen dos posibilidades alélicas en un mismo individuo, cada una con un número de repeticiones que podrá ser igual o distinto. Para saber si dos individuos están relacionados genéticamente, se comprueba el número de repeticiones de cada secuencia alélica en ambos y se determina el porcentaje de coincidencia (Greytak et al.,2019). A mayor número de repeticiones coincidentes, mayor probabilidad de que exista relación entre ellos frente a la hipótesis de que no están relacionados genéticamente.

1.2 El ADN y la identificación humana

Debido a los descubrimientos de Rosalind Franklin obtenidos a partir de la difracción de rayos X, Watson y Crick pudieron elaborar en 1953 el modelo de la doble hélice de ADN, relacionándolo con su estructura y composición. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula de doble cadena formada por grupos fosfato, una pentosa y una base nitrogenada que pueden ser adenina, guanina (bases púricas), timina o citosina (bases pirimidínicas). La doble cadena tiene carga negativa, es antiparalela y complementaria, por lo que la información contenida en una de las cadenas se complementa con la información presente en la otra cadena. (H C Crick, 1953) Esta secuencia de bases nitrogenadas de la cadena, siguiendo el dogma central de la Biología molecular, es la que se va a traducir para la síntesis de proteínas, dando lugar a los diferentes fenotipos de todo ser vivo. Por esta razón, hay regiones en las que el ADN es codificante, es decir, contiene la información para la síntesis de proteínas, y otras regiones en las que el ADN es no codificante, en la cual su información no tiene, aparentemente, utilidad (Lorente, J.A., 2004).

El ADN codificante, supone cuantitativamente la menor porción del genoma humano (Figura 1) y, aunque posee gran interés médico por su papel en la expresión de proteínas, posee poca variabilidad a excepción de la región HLA (Human Leukocyte Antigen) (Carracedo A., 1996). Por otro lado, las regiones no codificantes del ADN, que constituyen la mayor parte del genoma, no condicionan ninguna variación fenotípica, pero son claves en el proceso de identificación de individuos gracias a que son enormemente polimórficas.

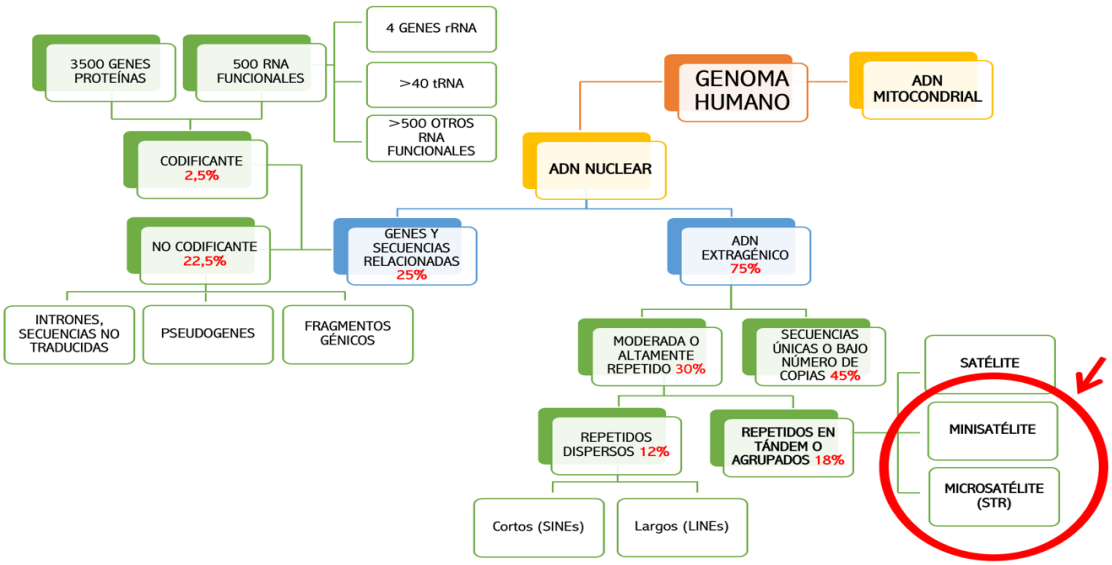


Figura 1. Organización del Genoma Humano. Realización propia

El primer locus polimórfico identificado en 1985 por el catedrático de Genética británico Alec J. Jeffreys supuso la introducción del método denominado “DNA fingerprinting” o “huella genética” y el inicio del desarrollo de este campo de la ciencia forense (Crespillo Márquez et al., 2019) A raíz del novedoso suceso, fueron descubriéndose loci hipervariables a los que se les denominó VNTRs (“Variable Number of Tandem Repeat”), polimorfismos de repeticiones en tándem de secuencias de nucleótidos (20-100 pb). Según el tamaño de los elementos de repetición (VNTRs secuencias de nucleótidos mayores, STRs menores, alrededor de 4 nucleótidos por repetición), estos se clasifican en ADN satélite, minisatélite (VNTRs) y microsatélite (STRs) (Greytak et al.,2019).

Llamamos ADN microsatélite al cual está formado por repeticiones de pequeño tamaño (de 2 a 5 pares de bases) de ADN no codificante, denominados STRs (short tandem repeat). El ADN microsatélite y el ADN minisatélite (repeticiones de unos 30 pares de bases), son extremadamente polimórficos; presentan gran variabilidad en el número de repeticiones y, por tanto, son los más útiles y empleados en identificación genética.

Aunque los primeros polimorfismos usados con fines forenses fueron de ADN minisatélite, el ADN microsatélite (polimorfismos STRs) ha ido reemplazando su uso. Podemos encontrar STRs distribuidos por todo el genoma y aparecen de media uno por cada 6-8 kilobases (Carracedo A., 1996). Además, su estabilidad y resistencia a la degradación, gracias a su pequeño tamaño, los ha convertido en el material por excelencia para su análisis

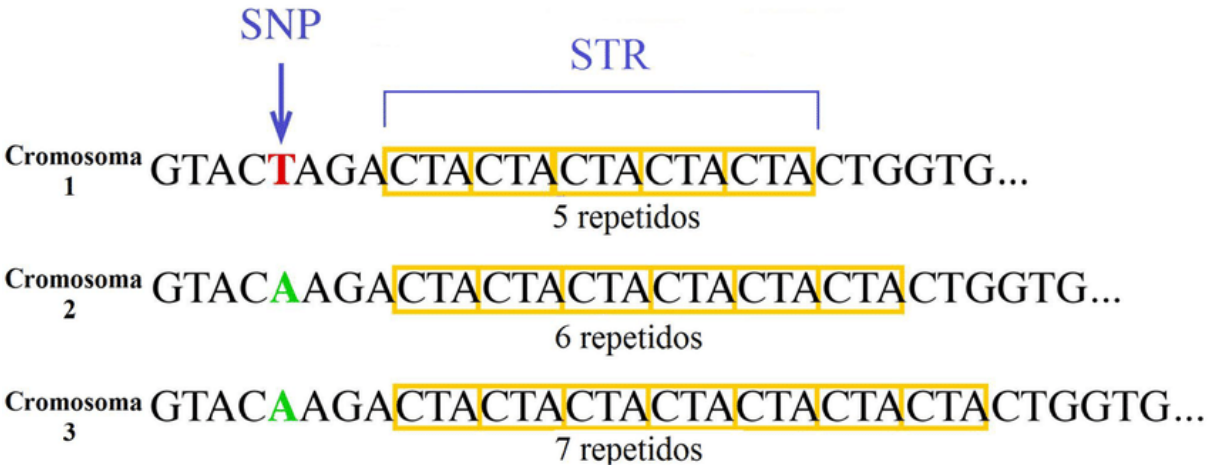


Figura 2. Repeticiones en STRs. Extraída de (Short Tandem Repeats n.d.)

Tanto STRs como minisatélites son heredados según la herencia mendeliana, por ellos su estudio en las identificaciones genéticas con relación de familiaridad, como se muestra en la figura 3. En la figura vemos tres ejemplos para el locus AGAT: (1) Individuo con 7-6 repeticiones; (2) individuo con 4-19 repeticiones; (3) Individuo con 12-14 repeticiones.

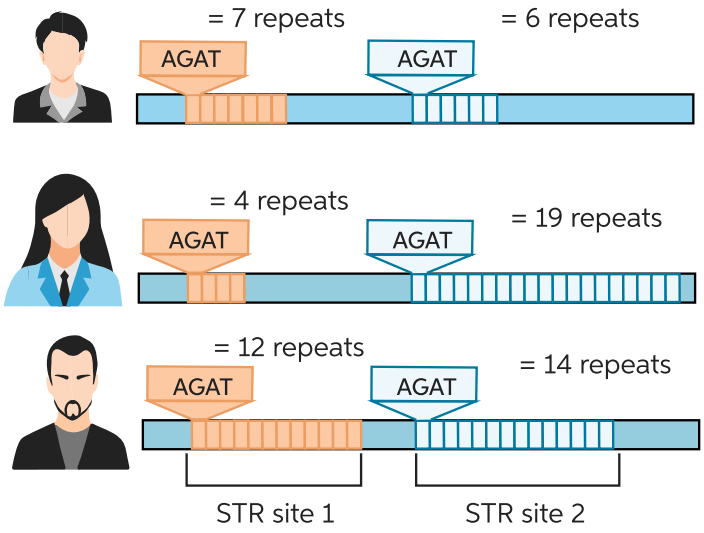


Figura 3. Ejemplo de los patrones de los microsatélites o STRs (Chegg Inc., 2022)

Por herencia mendeliana simple, cada individuo hereda X repeticiones STRs del cromosoma materno e Y repeticiones del cromosoma paterno homólogo para el mismo locus. (Short Tandem Repeats n.d.)

El estudio del número de repeticiones de estas regiones (STRs), único para cada individuo, permite la obtención de perfiles genéticos y constituye la base de los estudios forenses. Si en la comparación o cotejo de dos muestras (una indubitada o

de referencia cuya procedencia se conoce y otra dubitada cuya procedencia o identidad se desconoce), encontramos coincidencia total en el número de repeticiones y podemos hablar de compatibilidad genética en términos de probabilidad. Es decir, si el número de repeticiones coincide, podemos decir que dos individuos están relacionados genéticamente con una alta probabilidad frente a la hipótesis de que sean individuos aleatorios de la población no relacionados genéticamente. Esto es útil para predecir si una muestra pertenece a un individuo en particular, así como para establecer relaciones de parentesco entre dos muestras de referencia.

1.3 Otros marcadores

En nuestras células podemos encontrar ADN nuclear y ADN mitocondrial (se encuentra en el interior de las mitocondrias). Los STRs de ADN nuclear autosómico, gracias a su nivel de diversidad y tasa de mutación, son a día de hoy los principales marcadores empleados en identificación individual (Crespillo Márquez et al., 2019). Sin embargo, en algunas ocasiones, como en casos difíciles de paternidad, los STRs del cromosoma Y tienen una gran trascendencia, así como en casos donde ADN femenino y masculino se encuentran mezclados (por ejemplo, casos de agresión sexual). El cromosoma Y tiene características peculiares: por un lado, la mayor parte de este cromosoma no recombina durante la meiosis (Carracedo, 1996), por lo que se puede decir que las secuencias que éste posee se heredan en bloque por vía paterna; por otro, aun presentando baja diversidad, presenta un gran número de polimorfismos. Por su forma de transmisión y la ausencia de recombinación, el cromosoma Y puede ser útil en casos de determinación biológica del parentesco por línea paterna y suele ser un análisis complementario, en este tipo de situación, para confirmar parentescos ya que es igual entre hermanos y entre padre e hijo, lo cual es una desventaja porque no permite discriminar entre individuos relacionados por vía paterna). También Criminalística (no se enmascara en mezclas con una gran cantidad de ADN de mujer, lo que lo hace ideal para estudios en casos de agresiones sexuales). El hecho de que se herede en grupo y se conozca su tasa de mutación permite hacer estudios de evolución (haplogrupos de cromosoma Y).

Por otro lado, el análisis de los STRs del cromosoma X se emplea para complementar el análisis de otros marcadores (autosómicos, del cromosoma Y o de ADN mitocondrial) pero no de manera habitual.

Otro de los grandes objetivos que han perseguido los científicos forenses es el desarrollo de marcadores SNPs (single nucleotide polymorphism), variaciones de un único nucleótido con alto poder discriminatorio. Los SNPs aparecen con una frecuencia de 1 SNP por cada 1000 pares de bases y son los polimorfismos más numerosos de todo el ADN, suponiendo hasta un 85% de las variaciones de todo el genoma (Nuñez Domingo C. et al., 2011). Siendo modificaciones de un solo nucleótido, para su análisis se necesitan fragmentos de ADN más cortos que al analizar STRs; por ello, suponen una solución en casos de muestras degradadas y ADN más fragmentado (Crespillo Márquez et al., 2019).

Los SNPs de ADN nuclear, mitocondrial y del cromosoma Y son, gracias a su baja tasa de mutación y su evolución más lenta en el tiempo, los marcadores elegidos en la determinación de procedencias geográficas y étnica de una muestra [6,8]. Además, por su abundancia en el genoma, son útiles en estudios de ancestralidad y en la caracterización fenotípica de individuos. Es poco probable que los SNP reemplacen la batería de loci STR en un futuro previsible. Sin embargo, los marcadores SNP desempeñarán un papel importante en el análisis de muestras forenses difíciles, como aquellas que están muy degradadas, para aumentar el poder de los análisis de parentesco y las reconstrucciones familiares de personas desaparecidas y restos humanos no identificados, así como para proporcionar valor principal de investigación en algunos casos sin sospechoso (y sin coincidencia de STR en CODIS). ((Budowle & Van Daal, 2008).

Aunque se ha estado hablando constantemente de ADN nuclear, el que se encuentra en el interior del núcleo, no es el único que compone el genoma humano, dicho anteriormente. La mitocondria es un orgánulo de doble membrana localizado en el citoplasma celular cuya función primordial es la generación de adenosín trifosfato (ATP), molécula encargada del intercambio genético. Normalmente se heredan de un solo progenitor, habitualmente de la madre en animales (Pierce, 2006).

Aunque el descubrimiento de la mitocondria no fue del todo claro, el desarrollo del microscopio electrónico permitió la observación de áreas de baja opacidad a los electrones en las mitocondrias que, por medio de distintos métodos de fijación, a

varios niveles de pH y a distintas concentraciones de salinidad, lo que indicaba que dichas áreas eran componentes estructurales de las mitocondrias. Además, si se usaba un contraste con metales pesados en tejidos vivos se obtenían las mismas imágenes que las estructuras con ácidos nucleicos ya conocidas; así, empleando una fijación de tetraóxido de osmio, se podía observar una estructura fibrosa en las mitocondrias en forma de barra, en ocasiones con pequeños filamentos, que se extendía por toda la periferia de la mitocondria (Nass&Nass, 1963). Se trataba de ADN mitocondrial, situado, como su propio nombre indica, en las mitocondrias.

El ADN mitocondrial tiene 16.569 pares de bases aproximadamente, es circula y de doble cadena. La mayoría del genoma mitocondrial codifica las proteínas necesarias para el proceso de la fosforilación oxidativa, necesario para la producción celular de energía. Aunque también, en el ADN mitocondrial, hay una región control de unos 1122 pares de bases aproximadamente, que es denominada región control, que contiene el origen de la replicación del ADN mitocontrial, aunque no contiene ningún tipo de información para la síntesis de la ninguna de las proteínas; por lo que se denomina región no codificante. (Álvarez et al., 2001.).

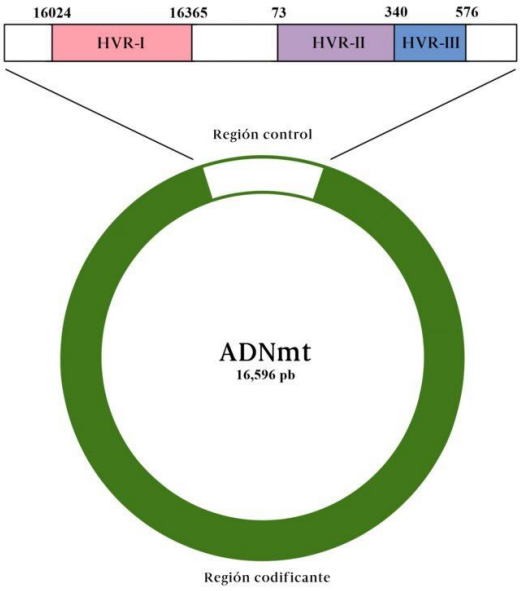


Figura 4. Estructura simplificada ADN mitocondrial. Extraida (Corona SV, Estrada MG., n.d.).

El ADN mitocondrial presenta una serie de características que lo hacen interesante para multitud áreas de estudio (Álvarez et al., 2001.):

- Herencia materna. En la fecundación se produce la entrada de la cabeza del espermatozoide, estando las mitocondrias de este en el cuello, sin embargo, se

ha demostrado que algunas de las mitocondrias del cuello del espermatozoide pueden penetrar en el óvulo, pero éste es capaz de eliminarlas por ubiquitinación (Pakendorf B, Stoneking M., 2005) (Sutovsky P., et al., 1999) Por lo tanto, el haplotipo de hermanos, hijos, madre, y en general los parientes por línea materna es idéntico (Figura 5 muestra la herencia de ADN mitocondrial), lo que lo hace útil para la determinación biológica del parentesco por línea materna.

- Alto número de copias. El número de mitocondrias presentes en cada célula es de 10 a 100, tendiendo cada una de ellas de 10 a 100 copias de ADN, ideal por tanto para muestras mínimas.
- Alta tasa de mutación. El ADN mitocondrial presenta una tasa de mutación 5-10 veces mayor que el ADN nuclear, debido a que está presente en una zona en la que es atacado constantemente con radicales libres, al tiempo que no está protegido por el empaquetamiento con histonas característico del ADN nuclear, a lo que se une la baja fidelidad de la polimerasa del ADN mitocondrial y la carencia de mecanismos de reparación.
- Heteroplasmia. En algunos casos se da que coexistan dos secuencias distintas de ADN mitocondrial, ya sea en una misma mitocondria, en una misma célula o en mismo individuo, lo que determina la segregación replicativa en los niveles de heteroplasmia. Esto ocasiona problemas en la interpretación, pero hace que aumente del poder de discriminación si se detecta bien.

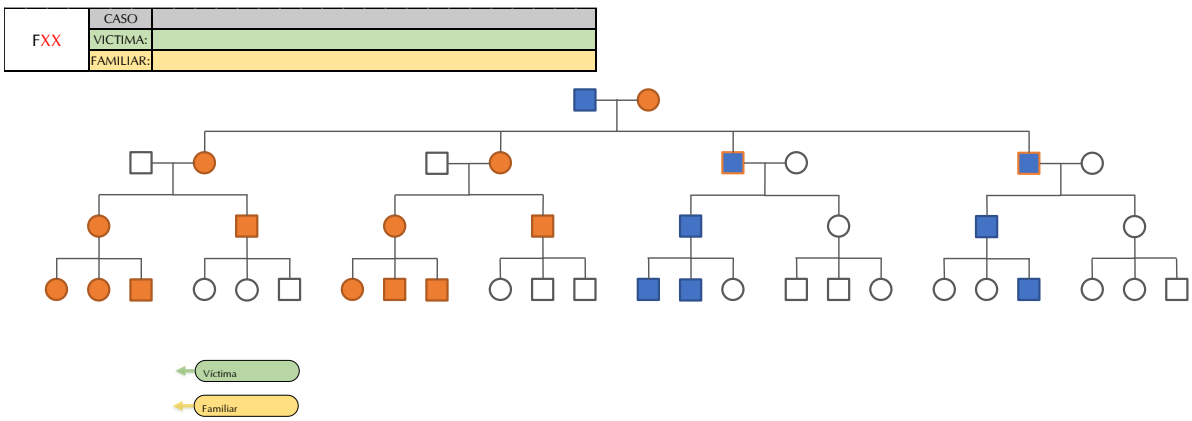


Figura 5. Esquema de la herencia materna del ADN mitocondrial. Herencia mitocondrial señalada en naranja y herencia cromosoma Y señalado en azul. Fuente: Laboratorio de Identificación Genética (Universidad de Granada).

En las últimas décadas, gracias al logro de la secuenciación completa de este tipo de ADN y de sus ventajas ya descritas, el ADNmt es de gran interés para los estudios genéticos forenses(Crespillo Márquez et al., 2019).

1.4 Actualidad Genética Forense

Avances tecnológicos

La extracción de ADN antiguo (ADNa), clave para el proceso analítico posterior, depende de la cantidad de éste que sea posible obtener, el daño o degradación que presente y la presencia de inhibidores de la amplificación de marcadores por PCR (Miloš A. et al., 2007). Las condiciones ambientales de temperatura, humedad y pH a las que se vean sometidas las muestras determinan de igual manera el grado de degradación del ADN y el resultado de la identificación (Saiz M. et al., 2021). Para obtener un perfil genético que permita la identificación de individuos a partir de una muestra ósea antigua, es necesario cumplir una serie de requisitos en la purificación, extracción y cuantificación de ADN que faciliten su análisis.

La aparición del sistema PCR multiplex, capaz de amplificar varios STRs simultáneamente en la misma muestra, junto al desarrollo de nuevos kits de extracción y purificación de muestras que permiten obtener mejores resultados de calidad y cantidad de ADN, han revolucionado y abierto numerosas puertas a esta ciencia, extendiendo su aplicación a la mayoría de áreas biomédicas.

Por otra parte, podemos hablar de la NGS como una revolución en el mundo de la Genética Forense. NGS es el nombre que se le da a al conjunto de plataformas diferentes que trabajan en el marco de la tecnología de la secuenciación, y que tienen en común la secuenciación de millones de fragmentos de ADN en paralelo y el uso de técnicas de análisis de Bioinformática para poner esos fragmentos en relación y obtener, de esta manera, información del genoma individual completo, técnica que cada vez se emplea más habitualmente en el ámbito clínico (Behjati, 2013). Los alcances que puede tener la NGS en la Genética Forense son diversos, permitiendo aumentar la exactitud de las investigaciones sobre suelos que diferencian los mismos estudiando los microorganismos que los habitan, y, por supuesto, para los estudios de ADN (Børsting, 2015). Las ventajas de la NGS para el análisis de ADN son diversas: tanto en análisis de STRs autosómicos como del cromosoma Y permitiría

una detección de mezclas más sencilla, al tiempo que facilita el cálculo de la proporción de la misma, permitiendo además el análisis de SNPs autosómicos, que proporcionarían una enorme cantidad de información de linajes, ancestría y marcadores fenotípicos como puede ser el color de la piel, del pelo o incluso de los ojos. (Álvarez-Cubero MJ. et al., 2017).

Base de datos

La creación de bases de datos que recogen de forma unificada los numerosos perfiles genéticos que se obtienen, tanto de muestras dubitadas como indubitadas, y que facilitan su cotejo posterior, ha hecho que la identificación genética con ADN sea la principal herramienta en casos donde las técnicas forenses convencionales (como la antropología, la dactiloscopia o el examen forense) no alcanzan a dar un resultado. Sus múltiples aplicaciones, no sólo de interés legal sino también social, incluyen tareas tan importantes como:

- **Criminalística.** Uno de los principales y más conocidos usos de la identificación con ADN es la creación de bases de datos forenses con el fin de favorecer la resolución de casos de investigación criminal, tanto para identificar a criminales como para exculpar a personas inocentes de crímenes que no cometieron.
- **Pruebas de parentesco.** El número de repeticiones de STRs autosómicos o el estudio del ADNmt (herencia puramente materna) o del cromosoma Y (herencia puramente paterna) permiten establecer la paternidad o maternidad biológica.
- **Importancia histórica.** La identificación genética también ha llegado a casos de interés histórico como por ejemplo la recuperación de especies en peligro de extinción como el esturión y la identificación de personajes históricos como Cristóbal Colón y sus familiares.
- **Identificación de personas desaparecidas.** Se basa en la elaboración de bases de datos civiles compuestas por muestras de referencia o indubitadas de ADN de familiares conocidos, obtenidas bajo consentimiento y de forma voluntaria, y muestras dubitadas de ADN de las personas no identificadas (cadáveres y restos humanos de catástrofes, masacres, guerras y otros problemas sociopolíticos, como la trata de personas) con las que poder compararlas (Álvarez-Cubero MJ. et al., 2010).

En relación a la identificación de personas desaparecidas, el proceso de identificación genética de restos óseos constituye uno de los mayores desafíos. Aunque es posible obtener ADN prácticamente de cualquier tejido (Alvarez-Cubero MJ., et al., 2012), en ocasiones en las que existe una alta degradación, el tejido óseo se convierte en la única fuente de material genético disponible. Tanto huesos como dientes, gracias a sus características fisicoquímicas, protegen el ADN en su interior lo cual, al igual que supone una ayuda en su preservación, dificulta su obtención.

1.5 Qué consideramos ADN antiguo

Hablamos continuamente de ADN antiguo, pero ¿qué se considera ADN antiguo?
Nos encontramos con diversas opiniones en el mundo de la ciencia, las cuales podemos agrupar en dos grupos: los que consideran ADN antiguo como cualquier estudio del material genético realizado sobre organismos muertos (Hofreiter et al., 2001), entretanto otros entienden como ADN antiguo el obtenido de especímenes de museo, fósiles, y en resumen, de organismos ya extinguidos (Pevsner, 2009). También nos encontramos con los que separan el ADN antiguo del ADN forense, aunque compartan las mismas técnicas, y diferenciándose en su finalidad (Graham, 2007).
Quizás, podríamos encontrar una conexión en este tipo de definición, tal que, podemos considerar que ADN antiguo sería el estudio del material genético de cualquier muestra no viva que se encuentre en un estado de degradación tal que las técnicas rutinarias de investigación de ADN no permitan obtener un resultado, incluyendo las siguientes categorías (Montiel Duarte, 2003):

- ADN forense: Muestras cuya finalidad es auxiliar al Derecho en alguna cuestión
- ADN envejecido: Material biológico archivado, incluido en parafina, de cortes histológicos, o similar.
- ADN antiguo: Muestras del ámbito arqueológico y paleoantropológico o especímenes de museo.
- ADN geológicamente antiguo: Muestras fosilizadas con millones de años.

1.6 ADN en el Contexto Histórico-Actual de la Memoria Democrática

Entre 1936 y 1939 se vivió uno de los períodos más determinantes de la historia de España, la Guerra Civil Española, una contienda militar entre dos bandos (el republicano democrático y el sublevado, autodenominado nacional) que culminó en un cambio de régimen e inició un largo período de dictadura militar (1939-1975), el régimen franquista. Miles de hombres y mujeres fueron asesinados por razones políticas, ideológicas o religiosas. A día de hoy, gran parte de estas víctimas siguen sin haber sido identificadas y yacen en fosas comunes por todo el país.

Con el fin de la dictadura franquista en el año 1975, tras la muerte del general Francisco Franco, se pone fin al período totalitario y se inicia una transición hacia la democracia, en cuya consolidación surgen colectivos formados por familiares afectados con el fin de reclamar, de forma legítima y en acto de gran lealtad, la búsqueda y recuperación de sus familiares desaparecidos. Se hablan de cifras entre 140.000 y 150.000 personas desaparecidas.

En el año 2000 se creó la Asociación para la Recuperación de la Memoria Histórica a raíz de la lucha de Emilio Silva por recuperar a su abuelo, víctima de desaparición forzosa en 1936, y al que se consiguió localizar, exhumar e identificar en una fosa común en Priaranza del Bierzo (provincia de León) gracias a la labor interdisciplinar de arqueólogos, antropólogos y médicos forenses, contando con la colaboración de las entidades y autoridades locales.

Con posterioridad, esta asociación además de otras muchas iniciativas de igual propósito, como por ejemplo el Foro por la Memoria en Andalucía, llevaron a cabo la exhumación de restos óseos de numerosas fosas comunes que hasta el momento suponían una realidad oculta.

Es en el año 2007, con el gobierno de José Luis Rodríguez Zapatero, cuando todo este movimiento se ve amparado legalmente con la promulgación de la Ley 52/2007 de Memoria Histórica, del 26 de diciembre, “por la que se reconocen y amplían derechos y se establecen medidas a favor de quienes padecieron persecución o violencia durante la guerra civil y la dictadura”.

En el año 2011, el Ministerio de Justicia hizo público un Mapa de Fosas, así como un Protocolo de actuaciones en exhumaciones, con el objetivo de unificar criterios e impulsar las actuaciones encaminadas a la identificación de todas las víctimas.

A fecha de hoy, este mapa contiene información de 2432 fosas localizadas en todo el territorio español clasificadas en: fosas no intervenidas, fosas exhumadas, fosas desaparecidas y fosas trasladadas al Valle de los Caídos. Dicha información, además de la referente a las víctimas identificadas en cada caso, es pública, se actualiza constantemente y se puede acceder a ella a través de la página oficial del Gobierno de España:
https://www.mpr.gob.es/memoriademocratica/mapa-de-fosas/Paginas/index.aspx.
No obstante, a nivel nacional, hay un proyecto de ley para la Memoria Democrática, el cual tiene diversas modificaciones con respecto a la Ley 52/2007 como la búsqueda de desaparecidos o la creación de Fiscal de Sala de Derechos Humanos y Memoria Democrática.
Según el Boletín Oficial del Estado (BOE), en la comunidad de Andalucía, la ley 2/2017, de 28 de marzo se denomina Ley de Memoria Histórica y Democrática de Andalucía. En esta, se incluye la Ley 52/2007, de Memoria Histórica a nivel estatal y la de Memoria Democrática definida como *la salvaguarda, conocimiento y difusión de la historia de la lucha del pueblo andaluz por sus derechos y libertades para hacer efectivo el ejercicio del derecho individual y colectivo a conocer la verdad de lo acaecido en la lucha por los derechos y libertades democráticas en el período que abarca desde la proclamación de la Segunda República española, el 14 de abril de 1931, hasta la entrada en vigor del Estatuto de Autonomía de Andalucía, el 11 de enero de 1982, así como la promoción del derecho a una justicia efectiva y a la reparación para las víctimas andaluzas del golpe militar y la Dictadura franquista.*(Boletín Oficial del Estado. Ley 2/2017, de 28 de marzo, de memoria histórica y democrática de Andalucía. 2017)
La Junta de Andalucía, institución de autogobierno de la Comunidad Autónoma de Andalucía, cuenta con su propio mapa de fosas.

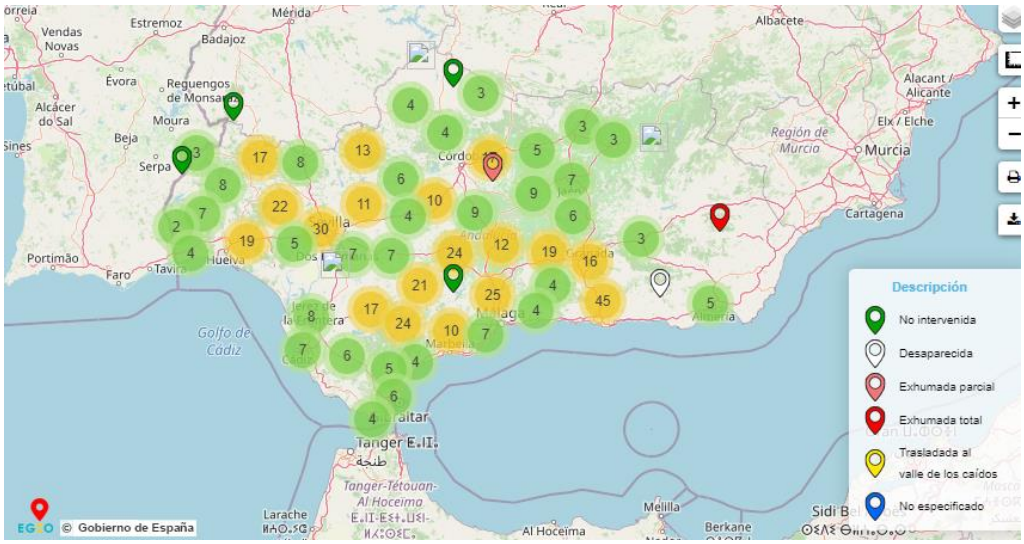
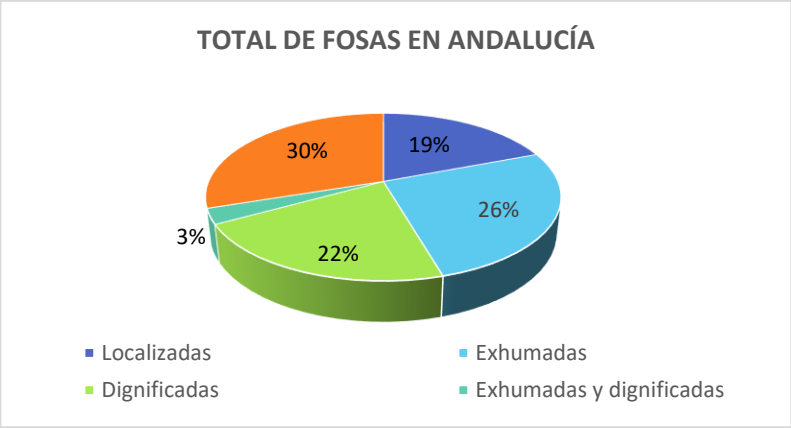
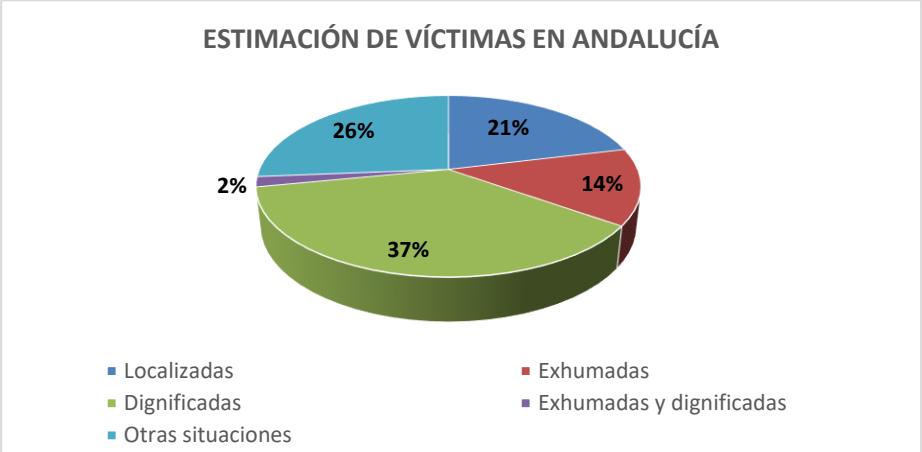


Figura 6. Mapa de Fosas de la Junta de Andalucía. Fuente: Gobierno de España. Buscador de Fosas Memoria Democrática

Dicha comunidad autónoma cuenta con 708 fosas totales y una estimación de víctimas de 45.566 aproximadamente. Estas fosas pueden encontrarse en diferentes situaciones como pueden ser: fosas localizadas (se conoce la existencia y la localización), exhumadas, dignificadas (acotación del terreno dándole especial importancia con algún tipo de conmemoración) y/o exhumadas y dignificadas (se han extraído los restos y se existe algún símbolo de conmemoración). Según el estado en que se encuentren o la provincia/municipio, se puede observar el estado (Gráfica 1 y Gráfica 2).



Gráfica 1.Estimación de víctimas en Andalucía según el estado de la fosa. Fuente: https://www.juntadeandalucia.es/organismos/culturaypatrimoniohistorico/areas/memoria-democratica/fosas/mapas-fosas.html



Gráfica 2. Total de fosas en Andalucía según el estado de la fosa. Fuente: https://www.juntadeandalucia.es/organismos/culturaypatrimoniohistorico/areas/memoria-democratica/fosas/mapas-fosas.html

Los datos representados en la gráfica 2 representan la cantidad de fosas totales en cada situación descrita anteriormente. Dicha información se representa en forma de porcentaje; la situación conocida con un 26% es la exhumada, pero esto no influye en el número de víctimas ya que, en el Gráfico 1 también representado en porcentaje, se aprecia que el número más alto de víctimas está en las fosas dignificadas (37%). Así pues, se han dignificado fosas con muchos individuos, mientras que las fosas exhumadas contaban con muchos menos cuerpos.

Así mismo, en el año 2018, el Consejo de Gobierno de la Junta de Andalucía aprobó el I Plan Andaluz de Memoria Democrática 2018-2022 (I PAMD), que supone la coordinación y cooperación de entidades memorialistas, la ciudadanía y administraciones públicas, entre las que se encuentra el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada cuyo objetivo reside en la identificación genética y la creación de un banco de ADN para toda Andalucía con el que poder cotejar los perfiles genéticos de víctimas y familiares. Además, el Laboratorio cuenta además con el programa DNA-prokids, proyecto que pretende luchar contra la trata de seres humanos mediante de identificación genética de las víctimas y sus familiares, especialmente de menores.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado presenta el objetivo de revisar los protocolos de los procesos de obtención y análisis de muestras utilizadas en Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada para la Identificación de Víctimas en la exhumación de fosas. Además, se va a realizar una revisión de los resultados obtenidos hasta ahora en el Laboratorio con respecto a las identificaciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio forense e identificación genética a partir de restos óseos se necesitan dos tipos de muestras para su posterior cotejo: una dubitada, de origen desconocido, que corresponde a las muestras óseas de los individuos a identificar y otra, de origen conocido, indubitada o de referencia correspondiente a los supuestos familiares de dichas víctimas. La finalidad de este cotejo es encontrar vinculación genética a través de los perfiles genéticos obtenidos, y la creación de bases de datos para posibles vinculaciones futuras.

En general, las muestras tanto dubitadas como indubitadas siguen un protocolo preestablecido. ANEXO I

3.1 Análisis de Muestras Dubitadas

La estructura biológica que más y mejor permanece en el tiempo desde la muerte del individuo, son los restos óseos.

Cuando hablamos de tejido óseo, nos referimos a tejido conectivo denso especializado, compuesto por células enfrascadas en una matriz y con una calcificación que le confiere sus propiedades que lo diferencia del resto de los tejidos (elasticidad, resistencia, dureza), con las cuales cumple sus funciones principales como son la estructural, la protectora y la homeostasis con respecto al calcio.

En los huesos se pueden distinguir dos estructuras: por un lado, el tejido óseo duro o cortical, que se percibe como una masa sin huecos, y el tejido óseo esponjoso o trabecular, formado por placas lisas o trabéculas que se entrecruzan en diferentes direcciones (Figura 9). Las células óseas u osteocitos se sitúan en unas lagunas que se encuentran en las láminas que forman los sistemas de Havers. Podemos encontrar tres tipos de células óseas: osteoblastos (generadoras), osteoclastos (degradadoras) y osteocitos (células óseas), cuya función de estos últimos es el mantenimiento del tejido óseo (Brüel A., et al., 2012).

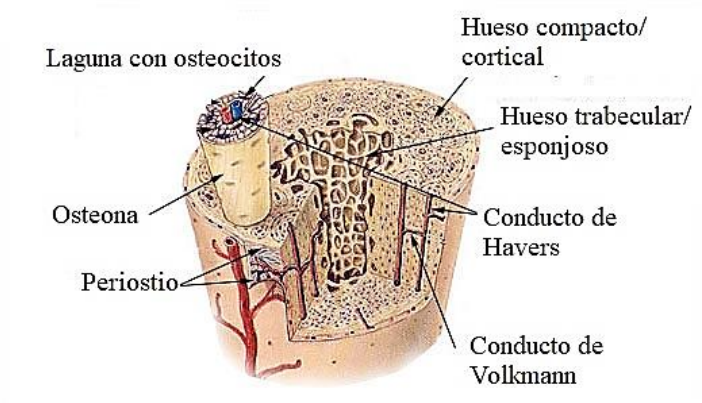


Figura 7. Esquema del tejido óseo cortical y trabecular. Extraído de: Wikipedia.

Quizás, podríamos decir con las características vistas que la mejor zona para la obtención de ADN es la médula ósea, el centro esponjoso donde se producen las células sanguíneas. Pero el problema de ello son los microorganismos que atacan mayoritariamente a esta zona. Por ello la zona a elegir para la obtención de material genético es la del hueso cortical, dónde encontramos osteocitos aislados en lagunas del hueso cortical que hace que se preserve el ADN, aislándolo de agentes patógenos. Según algunos estudios de análisis de STRs, se observó que las muestras de fémur y muestras dentales son las que mayor resultado positivo tienen para el análisis de ADN como podemos observar en la figura 10 (Miloš A., et al., 2007).

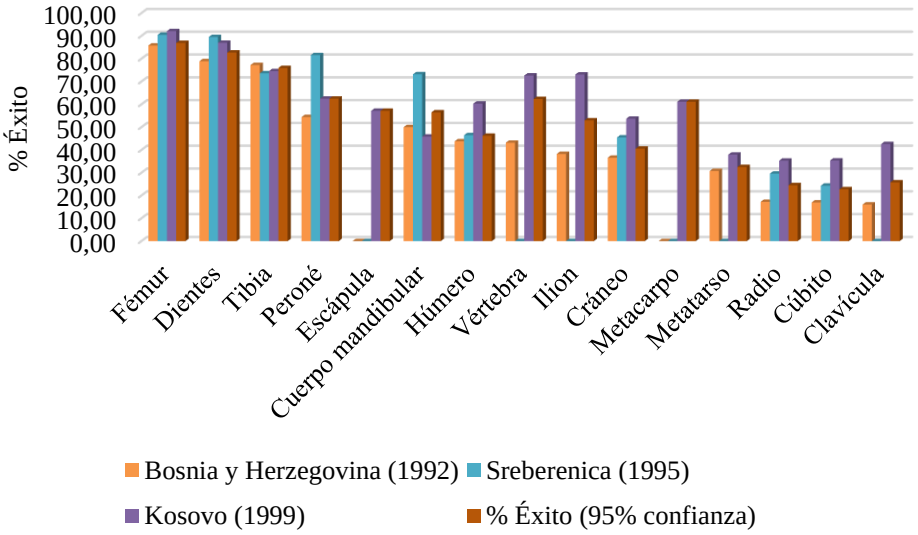


Figura 8. Ratio de obtención de un perfil por tipo de hueso. Fuente: Miloš et al., 2007.

Con respecto a este tema, y sabiendo que el hueso es una valiosa fuente de ADN en la identificación humana, se está estudiando la posibilidad de obtener mayor cantidad

de ADN y de mejor calidad en hueso petroso (zona del cráneo en la que se encuentra el canal auditivo) y comparándolo con fémur y dientes del mismo individuo. Por otra parte, otro estudio ha apuntado que se puede obtener ADN en buen estado de conservación a partir de las raíces de los dientes (Dutra Corrêa et al., 2017).

Por lo tanto, en el laboratorio de Identificación genética se prioriza los análisis en piezas dentales, siempre que se dispongan de ellas. Ante la ausencia de estas, se utiliza fémur u otros restos óseos que los antropólogos hayan considerado que están en mejor estado.

Los procesos de limpieza, pulverización y extracción se realizan en su totalidad en un laboratorio de extracción con condiciones adecuadas para el tratamiento de este tipo de muestras en el que las condiciones de vestimenta y aislamiento son para trabajar con ADN antiguo, reduciendo las posibilidades de contaminación. Estas condiciones son la luz ultravioleta para la esterilización cuando terminamos de trabajar, sistema de impulsión de aire estéril (presión positiva), suelo de vinilo y con la exhaustiva limpieza de las superficies y del material que nos pueda llevar a una contaminación (Poinar, 2003).

Solo se realiza la extracción y la preparación de la PCR en este laboratorio, pero los equipos necesarios se encuentran en la zona de post-amplificación situada en otro laboratorio diferente.

3.1.1 Limpieza

Para eliminar todos los residuos que puedan afectar a los resultados, se realiza una limpieza del material óseo.

En el caso de los dientes:

- Se lavan con agua destilada y con la ayuda de un cepillo se frota suavemente hasta eliminar todo tipo de impurezas que puedan tener adheridos.
- Se lija las piezas con un minitaladro para eliminar la mayor cantidad de esmalte posible.

En el caso de piezas óseas:

- Se elimina toda la parte externa y el hueso esponjoso con una banda de lija, obteniendo únicamente el hueso cortical.
- Se realizan 10 fragmentos de hueso de aproximadamente 0.5cm x 0.5 cm. Con el objetivo de reducir en la mayor cantidad posible la contaminación, este proceso se realiza en urnas de metacrilato y en campanas de extracción.

Las muestras se irradian en un esterilizador UV durante 10 minutos a cada lado de la muestra para eliminar cualquier tipo de contaminación superficial.

3.1.2 Pulverización

Dada la dureza de la matriz ósea y del tejido del diente, es necesario pulverizar las piezas para poder acceder al ADN y poder extraerlo. Para hacerlo, una vez las muestras están limpias, se introducen en viales que contienen una esfera metálica y se agita durante 1 minuto (2 ciclos) a 30Hz. Para ellos se utiliza el equipo TissueLyser II de Qiagen (Hilden, Alemania).

3.1.3 Extracción y purificación del ADN

Rutinariamente se realizan dos protocolos de extracción alternativos y paralelos, como son la extracción orgánica mediante la lisis con proteinasa seguida de purificación con Fenol/Cloroforma/alcohol isoamílico y extracción automatizada mediante Automate Express

<u>Protocolo Fenol-Cloroformo</u>

Tras la pulverización, se toma 1g del polvo de hueso obtenido para realizar la extracción del ADN y para eso es necesaria la preparación de un tampón específico ya que para cada gramo de muestra son necesarios:

- 4125µL de tampón EDTA 0.5M (pH 8)
- 375 µL de Proteinasa K (1mg/100 µL=10mg/ml)
- 200 µL de DTT 1M
- 300 µL de SDS 10%

Posteriormente las muestras se incuban en un horno de hibridación con agitación continuada a 56ºC durante 18-24h.
En este proceso, gracias a los detergentes DTT y SDS, se desnaturalizan las histonas donde se encuentra superempaquetado el material genético. Así, una vez desnaturalizadas, la enzima proteinasa K lisa la proteína tras cada aminoácido Lisina lo que resulta en la liberación total del ADN y lo hace accesible a la polimerasa para así poderlo replicar.
Para que los resultados sean fehacientes se realiza un control negativo que contiene todos los reactivos menos la muestra ósea pulverizada.

Tras la digestión, se extraerá el sobrenadante obtenido y se depositará en un nuevo tubo rotulado, al cual se añade una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1. El cloroformo desnaturaliza las proteínas, elimina los lípidos y solubiliza el fenol. Esto favorece la separación de los ácidos nucleicos que se mantienen en la fase acuosa. El alcohol isoamílico se agrega como antiespumante en el proceso de mezclado de las fases. Seguidamente, se centrifuga obteniendo dos fases; la inferior, más densa que contiene lípidos y proteínas, mientras que la superior es menos densa y contiene los ácidos nucleicos.

Figura 9. Diagrama de proceso de extracción por el método fenol-cloroformo. Fuente propia

Con posterioridad, la fase acuosa se introduce en un tubo que contiene un filtro Amicon Ultra 4 30kDa en su interior, previamente hidratado con 500 µL de agua estéril. Al hacer pasar la fase con menor densidad, el DNA quedará atrapado en el filtro y el resto de partículas menores de 30kDa (agua, azucares y sales) lo atravesarán y quedarán depositadas en el vial. Posteriormente, el tubo se centrifuga durante 1h (en teoría no debe estar tanto tiempo si el volumen del tubo con filtro es de 500ul-1000ul) a 2800rpm. El filtrado se descarta y queda el ADN en el filtro. Este se lava dos veces con 750 µL de agua y se vuelve a centrifugar, pero esta vez durante 20 minutos a 2800rpm.

Para terminar, se recupera el ADN del filtro. Con ayuda de una pipeta, se resuspende el líquido depositado en el fondo del tubo, que ayudará a resuspender el ADN de las paredes del filtro. Se retirará el filtro y se introduce del revés en un nuevo vial de mayor calibre esta vez. Se centrifugan a 3200rpm durante 5 minutos quedando el ADN en el fondo del tubo. Finalmente, se recupera el ADN y se depositará en tubos Eppendorf de 1.5 µL, ahora desechando el filtro. Seguidamente, se purifica el extracto para eliminar la posible presencia de inhibidores con las columas de sílica QIAquick de QIAGEN. Por último, se almacena el resultado a 4ºC hasta su posterior procesado.

Protocolo *PrepFiler®Express BTA Forensic DNA Extraction Kit*

En este protocolo, se parte de una cantidad menor, ya que, en vez de tomar 1000 mg de polvo de hueso, se parte de tres alícuotas de 200mg cada una.

Para llevar a cabo la lisis (PrepFiler ® and PrepFiler ® BTA Forensic DNA Extraction Kits, 2012) :

- Activar el agitador térmico a la temperatura de 56ºC
- Se introduce la muestra en el lugar que le pertenece, en el caso de restos óseos, en el tubo de rosca de 2mL
- Se prepara una solución de buffer de lisis inmediatamente antes de cada experimento teniendo en cuenta el 5% de error de pipeteo.

A continuación, se activará la extracción y purificación automatizada. Para ello es necesario (PrepFiler Express ™ and PrepFiler Express BTA ™ Forensic DNA Extraction Kits User Guide, 2010):

- Instrumento AutoMate Express™
- El kit correspondiente que contiene:
    - Cartuchos: Están diseñados para encajar en la ranura de la maquinaria en una sola orientación. Estos cartuchos tienen 10 pozos sellados y dos pozos abiertos para los tubos de calentamiento. Los pozos del 1 al 7 están precargados con los reactivos para realizar el protocolo de PrepFiler Express™. Los demás se encuentran vacíos.
    - Tubos PrepFiler™ que contengan la muestra lisada y preparada para la extracción.
    - Tubos de elución PrepFiler™.
    - Puntas AutoMate Express™.

Seguidamente se cargan las muestras y los tubos de elución. También se cargarán en este paso las puntas en las ranuras correspondientes.

Y por último se activará finalmente la extracción automatizada.

3.1.4 Cuantificación del ADN

Para realizar esta etapa del protocolo, se usa la PCR cuantitativa o real time PCR, cuya pieza fundamental son las sondas TaqMan. Estas sondas están marcadas con dos fluróforos diferentes que emiten luz a distinta longitud de onda, hibridando las éstas en las regiones de interés entre los dos primers a una temperatura superior a la de estos, con la intención de que precisamente hibriden cuando comience la polimerización. A esos dos fluróforos los llamamos: el indicador (R, de reporter), unido

al extremo 5’, y el inhibidor, (Q, de quencher), sintetizado en el extremo 3’. Cuando la sonda está libre el indicador está muy cerca del supresor, no observándose fluorescencia; es en la polimerización cuando la actividad 5’-exonucleasa de la Taq polimerasa libera la molécula indicadora, que, al no estar cerca de la supresora, emite fluorescencia (figura 12), de forma que únicamente se obtendrá fluorescencia con la síntesis de secuencias complementarias a la sonda TaqMan (Butler, 2011). Esta técnica tiene la capacidad de controlar el progreso de la PCR conforme se produce. Los datos se recopilan, por lo tanto, durante el proceso de PCR, en lugar de al finalizar esta. Este hecho revoluciona completamente el método de la cuantificación de ADN basada en PCR. En la PCR de tiempo real, las reacciones se caracterizan por ciclo en el que se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo en lugar de la cantidad de objetivo acumulado tras un número de ciclos. Cuanto mayor sea el número de copias de inicio del ácido nucleico objetivo, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia (Aspectos Básicos de La PCR En Tiempo Real | Thermo Fisher Scientific - ES, n.d.).

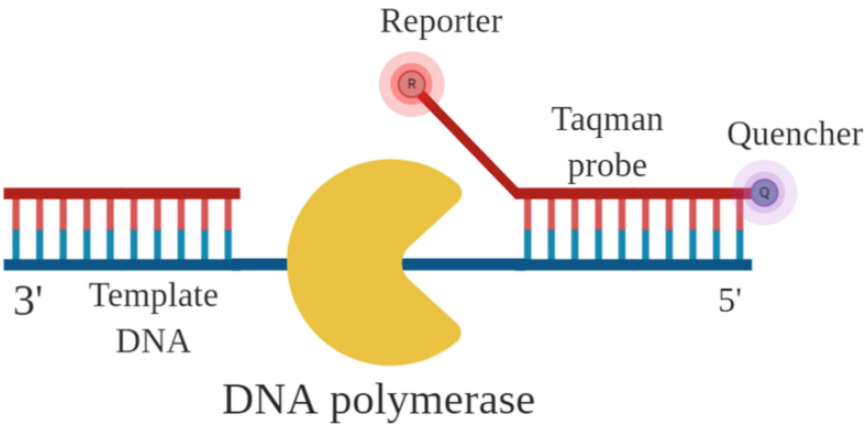


Figura 10. Descripción del proceso de rt-PCR (Haarkötter, et al.,2021)

Con el objetivo de obtener la mayor cantidad de información (degradación, inhibición, sensibilidad, cuantificación de ADN humano y de cromosoma Y) de las muestras óseas, se empleó el kit Quantifiler Trio, en un equipo QuantStudio 5 (ambos de Applied Biosystems).

Este kit Quantifiler Trio amplifica para tipos de objetivos:

1. Objetivo autosómico pequeño: Son amplicones de medidas pequeñas (80pb) y permite una mayor resolución de muestras de ADN degradadas (Thermo fisher scientific. GlobalFiler™ PCR amplification kit, 2018).

2. Objetivo autosómico largo (214pb): Se trata de indicadores del grado de degradación de la muestra, comparando la ratio de los resultados de la cuantificación con los objetivos autosómicos pequeños obtenidos (Thermo fisher scientific. GlobalFiler™ PCR amplification kit, 2018). La relación entre las amplificaciones de los dos objetivos autosómicos tanto pequeño como largo, nos indica el grado de degradación del ADN de la muestra.
3. Objetivo del cromosoma Y(75pb): Permite la cuantificación de muestras masculinas humanas de ADN genómico. Es particularmente útil en casos con mezclas de DNA genómico de hombre y mujer (Thermo fisher scientific. GlobalFiler™ PCR amplification kit, 2018).
Para llevar poderlo llevar a cabo se necesita el siguiente material:

- Quantifier™ Trio Primer Mix
- Quantifier™ THP PCR Reaction Mix
- Tubos de 1.5mL
- Bandeja óptica de 96 pocillos
- ADN extraído de las muestras
- Series de diluciones estándar
- Cubierta óptica adhesiva

El kit de Quantifiler incluyen un control interno de PCR (IPC, Internal PCR Control) que permite verificar que la polimerasa, el ensayo y el detector funcionan correctamente al estar el IPC marcado con un tipo de fluoroforos e hibridar con un molde sintético mientras que la sonda TaqMan para la región de interés está etiquetada con otro tipo de fluoroforos (luz azul), diferenciables espectralmente (Butler, 2011).

3.1.5 Amplificación de ADN por Polymerase Chain Reaction (PCR)

Los resultados obtenidos que se presentarán posteriormente, son obtenidos por dos kits (Yfiler Plus® y GlobalFiler™PCR Amplification Kit).
El kit GLobalFiler se realiza a todas las muestras. Por el contrario, el kit Yfiler Plus se realiza a las muestras en las cuales se detecte ADN de varón o lo que es lo mismo presencia de Y en la amelogenina (la relación por línea paterna sea procedente al compararlo entre muestras de restos óseos y familiares).
Para las amplificaciones, los diferentes kits están compuestos por reactivos que se asemejan de un kit a otro. Ellos están compuestos por un buffer a lo que llamamos

Master Mix (proporciona las condiciones para que se produzca la reacción de amplificación), parejas de primers (cada primer, es una secuencia de ADN sintetizada químicamente que hibrida de modo complementario en zonas que preceden o “flanquean” la región a copiar). Cada pareja de primer, actúa para identificar o "apuntar" a la porción de la plantilla de ADN que se va a copiar. Para comprobar la eficiencia del proceso de PCR y comprobar la posible contaminación se amplifican controles positivos y negativos respectivamente (Butler, J.M. 2005)

En cada ciclo, las hebras de ADN se separan (desnaturalizan) por calor. Seguidamente, la muestra se enfría a una temperatura adecuada para unir los cebadores de oligonucleótidos. Por último, la temperatura de la muestra se eleva a una temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa y para producir una copia de cada hebra molde de ADN. En cada ciclo, el número de moléculas de ADN se duplica(Ver figura 12) (Butler, J.M. 2005).

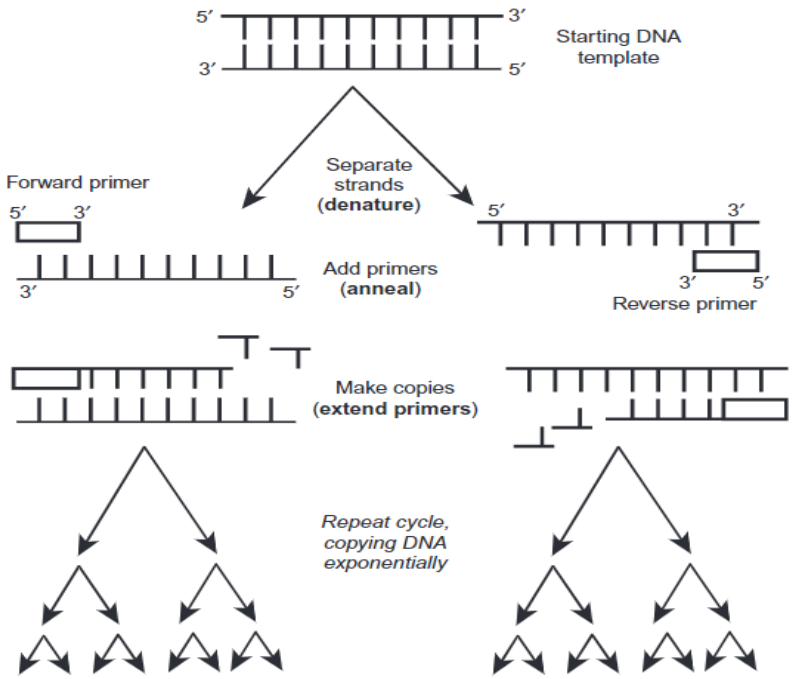


Figura 11. Proceso de amplificación de ADN con la reacción en cadena de la polimerasa. Fuente: Butler, J.M. 2005

3.1.6 Análisis de los datos por electroforesis capilar

Para poder visualizar los resultados obtenidos en el procedimiento anterior, se realizará una electroforesis capilar con el equipo ABI 3500Genetic Analyzer de Applied Biosystems ™.

La electroforesis capilar (CE) es la metodología principal utilizada para separar y detección de alelos de repetición corta en tándem (STR) en laboratorios forenses de ADN en todo el mundo.

El capilar es un tubo de vidrio de aproximadamente 50 cm de largo y 50 µm de diámetro. Está lleno de una solución de polímero viscoso que actúa como un gel al crear un entorno de tamizado para las moléculas de ADN. Las muestras se colocan en una bandeja e inyectado en el capilar aplicando un voltaje a cada muestra secuencialmente. Un alto voltaje se aplica a través del capilar después de la inyección para separar los fragmentos de ADN en cuestión de minutos. Los productos marcados con colorantes fluorescentes se analizan a medida que pasan por la ventana de detección y son excitados por un láser, emitiendo fluorescencia que es captada por una cámara CCD y generando un electroferograma. La adquisición de datos computarizados permite un análisis rápido y el almacenamiento digital de los resultados de la separación (Figura 14) (Butler, J.M. 2005).

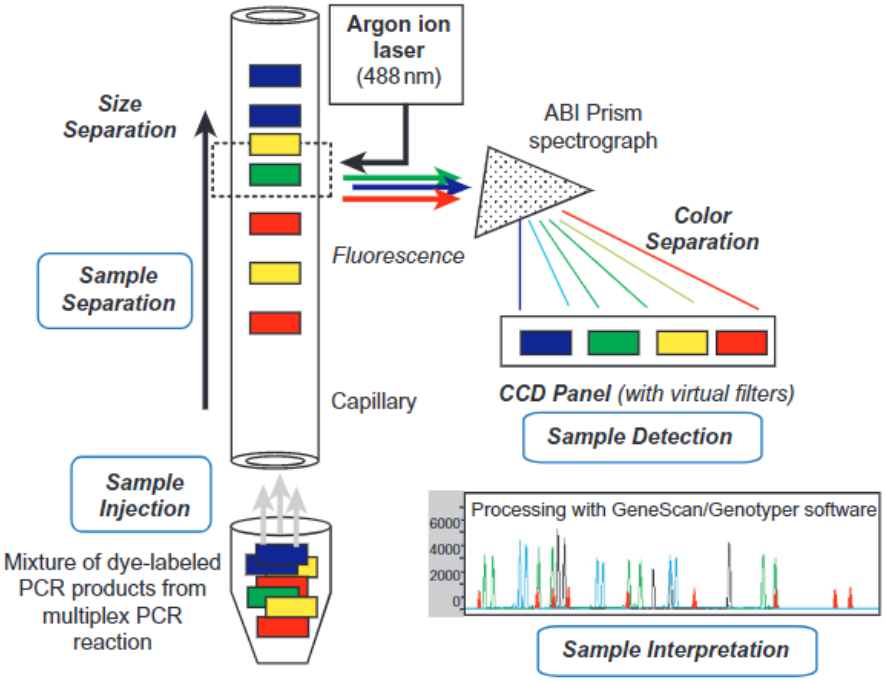


Figura 12. Electroforesis Capilar. Fuente: Butler, J.M. 2005

3.1.7 Análisis estadístico

Para empezar el análisis bioinformático se estudia las posibles relaciones familiares que pueden existir entre los individuos de las muestras, para ello se aplica el software

*Familias 3 (*Kling D. et al., 2014). Con los datos introducidos en el programa se realizan cotejos por medio de la herramienta de “búsqueda a ciegas”. Se tiene como criterio un *Likelihood ratio* (LR) superior a 1000 para considerar al emparejamiento como algún tipo de relación familiar, lo que significa que hay un 99,99% de probabilidades de explicar los resultados con la hipótesis de familiaridad que se plantea. También se extrae del programa el porcentaje de alelos compartidos entre muestras relacionadas.

3.2 Análisis Muestras indubitadas o de Referencia

Para cotejar y llegar a compatibilidades genéticas el Laboratorio debe recibir, junto a los restos óseos habitualmente o de forma independiente, muestras de referencia de los familiares de las víctimas.

De cada familiar, bajo consentimiento informado y de forma voluntaria, se obtienen 2 hisopos bucales en seco frotando la zona interna de las mejillas. Los hisopos son recogidos por arqueólogos y asociaciones memorialistas mediante kits de toma de muestras, y son registrados y etiquetados correctamente con un código que se mantendrá durante todo el análisis. Posteriormente, son remitidos al laboratorio siguiendo la cadena de custodia. Al tratarse de muestras recogidas en condiciones óptimas, el proceso analítico presenta menos dificultades, aunque sigue de forma muy similar todos los pasos.

3.2.1 Pretratamiento de Muestras

Las muestras de hisopado bucal se preparan en diferentes tubos Eppendorf para la fase de extracción de ADN. De los dos hisopos obtenidos de cada familiar, uno se corta con un bisturí esterilizado con lejía al 10%, agua destilada y etanol y se introduce en el tubo. El otro, junto con lo que sobra del primero, se guarda por si hubiese algún problema con el análisis.

3.2.2 Aislamiento de ADN

La obtención de ADN de las muestras de hisopado bucal se realiza en un sistema automatizado de columnas de centrifugado llamado QIAcube®. Este sistema de

extracción de ADN genómico utiliza el kit de extracción *QIAamp® DNA Investigator* que contiene buffers o soluciones para:

1. **Lisis** → Primero, gracias a un buffer de lisado, se disgrega la matriz extracelular que une a las células y se lisan de las membranas celulares para liberar el ADN de su interior.
2. **Purificación** → Segundo, un buffer de unión favorece la absorción del ADN en una fase sólida o membrana de sílice de modo que se concentra el material genético y se separa del lisado celular. Después, por un buffer de lavado, se centrifuga el ADN para desprenderlo de toda sustancia contaminante y, finalmente, se separa el ADN de la membrana de sílice, recuperándose en una solución de elución que contendrá el material genético ya purificado.

3.2.3 Cuantificación de ADN

Con el ADN extraído y purificado, el siguiente paso es la cuantificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, que permite separar las moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Los extractos de ADN que hemos obtenido de cada muestra se cargan en el gel junto con muestras estándar de tamaño y concentración conocidas y se añade un fluoróforo que se une al ADN y emite fluorescencia. Después, gracias a un transiluminador de luz ultravioleta, se visualizan los geles de agarosa y se estima la concentración de ADN.

La Amplificación de ADN, Secuenciación y análisis de fragmentos y secuencias de ADN y Análisis de resultados y creación de bases de datos con las muestras indubitas son idénticas que en el protocolo para muestras dubitadas.

4. RESULTADOS

Para alcanzar el objetivo de este trabajo de investigación y poder analizar los datos de las identificaciones genéticas de las víctimas de la Guerra Civil y Posguerra Española, se ha accedido las bases de datos con las que trabaja el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada. Dichos registros no contienen datos personales ni potencialmente identificativos desde su concepción, por lo que no ha sido necesario proceder a su anonimización.

La información obtenida para realizar el análisis estadístico de los datos y llegar a conclusiones incluye:

- Localización de las fosas comunes exhumadas de las que se han obtenido restos óseos.
- Número y tipo de restos óseos recibidos de cada fosa.
- Número de individuos a los que pertenecen dichos restos.
- Número de familiares por cada caso o fosa.
- Tipo de muestra de cada familiar.
- Relación de posible parentesco de cada familiar con las víctimas.
- Técnica de análisis (amplificación) de ADN empleada con la que se ha obtenido el perfil genético.
- Tipos de huesos de los que se han obtenido los perfiles genéticos.
- Número de identificaciones conseguidas por el laboratorio a partir de la comparación de los perfiles genéticos de restos óseos y familiares obtenidos.
- Relación de parentesco que ha permitido la identificación.

Para la elaboración de estadísticas, gráficos y tablas con las que presentar los resultados se han empleado los programas informáticos Excel y PowerPoint del paquete Microsoft Office 365 y DataStudio de Google.

4.1 Muestras Dubitadas

El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada cuenta con un total de 1519 muestras de restos óseos (pertenecientes a 1384 individuos), exhumados y seleccionados por equipos de arqueólogos de 51 fosas en el territorio de Andalucía, concretamente por provincias:

Tabla 1. Listado de casos o fosas exhumadas y número de muestras recibidas por provincias. Las fosas con 0 muestras corresponden a aquellas que han sido exhumadas pero de las que el laboratorio aún no ha recibido restos óseos. Fuente propia

PROVINCIA	LOCALIDAD/FOSA	NÚMERO DE MUESTRAS
CÁDIZ	Benamahoma	92
	Cádiz	1
	Cádiz	0
	Paterna de Rivera	8
	Puerto de Santa María	0
	Puerto Real	186
	San Fernando	107
	Setenil de Bodegas	6
	Trebujena	125
CÓRDOBA	Adamuz	9
	Castro de Río	60
	Córdoba	21
	Guadalcázar	2
	Monturque	14
	Obejo	4
	Santa Rita	16
GRANADA	Cúllar	13
	Nigüelas	27
	Pinos Genil	6
	Puerto Lope	6
HUELVA	Higuera de la Sierra	17
	Hinojos	0
	Huelva	2
	Nerva	77
	Zalamea la Real	4
JAÉN	Jaén	0
	Marmolejo	4
MÁLAGA	Alfarnate	3
	Álora	0
	Cártama	10
	Villanueva de la Concepción	0
SEVILLA	Aguadulce	3
	Alcalá del Río	14
	Benacazón	3
	Camas	11
	Camas	10
	Cañada Rosal	0
	Cazalla de la Sierra	120
	Dos Hermanas	0
	Écija	0
	El Madroño	46
	Guadalcanal	6
	La Campana	35
	Lora del Río	0
	Palomares del Río	4
	Puebla de la Cazalla	72
	Puebla de los Infantes	6
	Salteras	5
	Sevilla	339
	Utrera	20
	Villaverde del Río	5

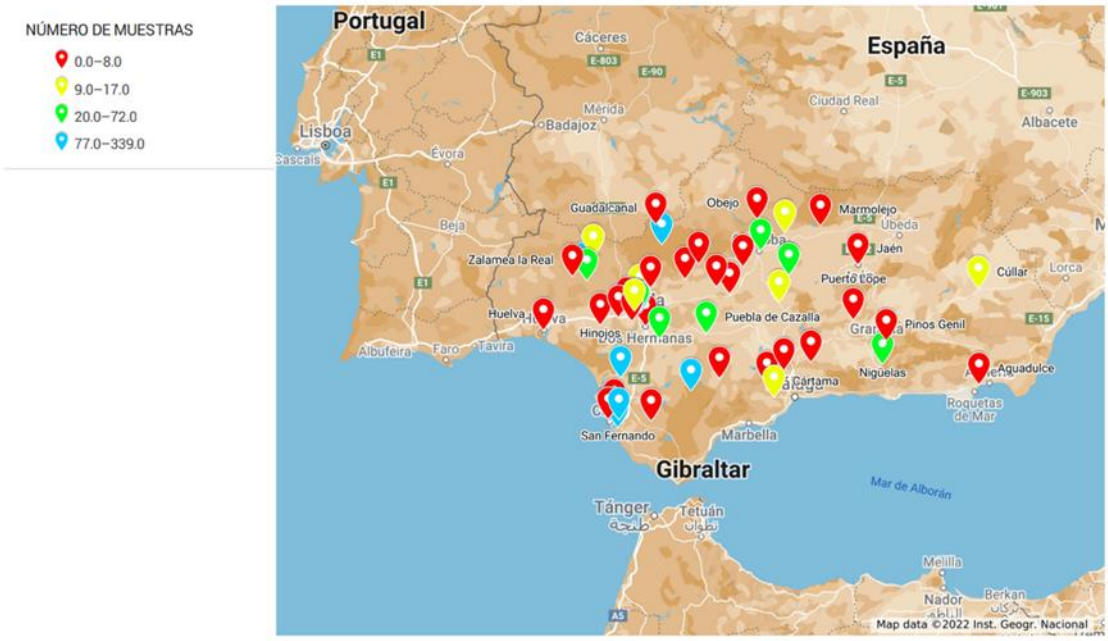
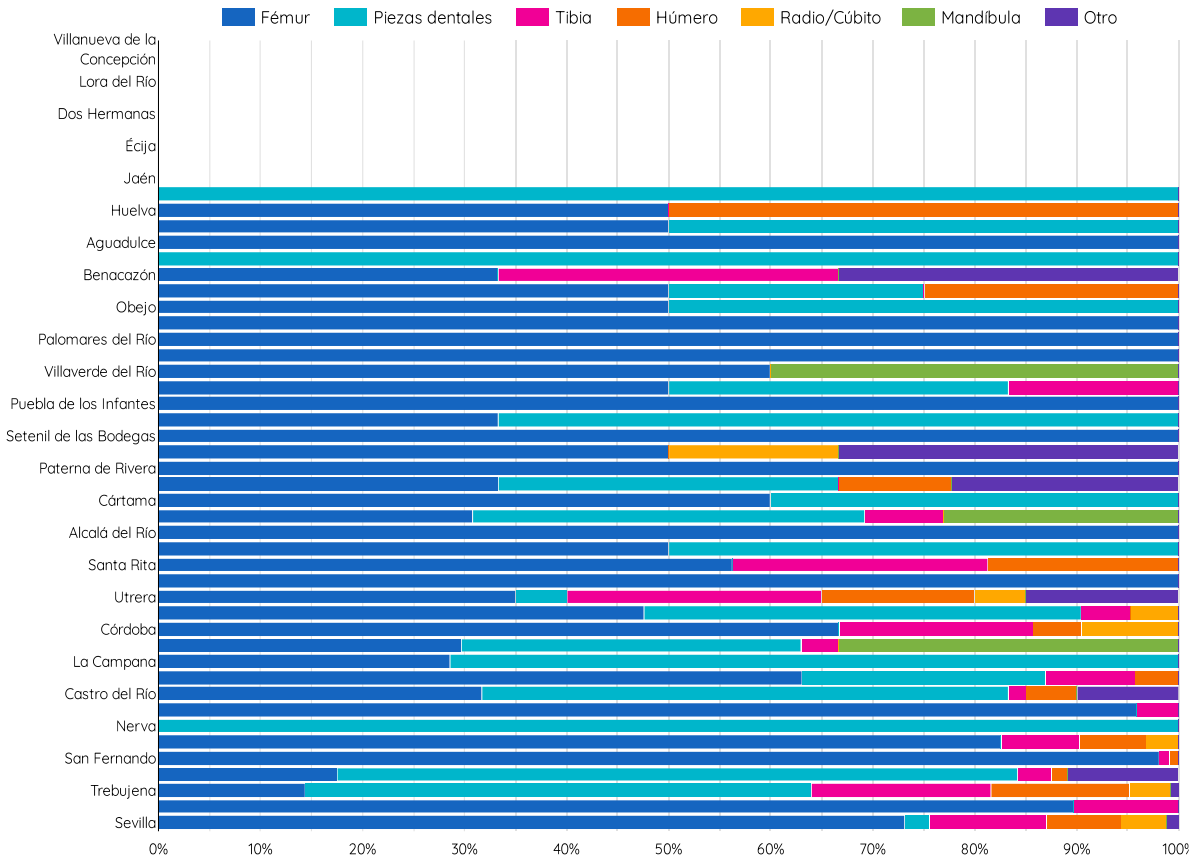


Figura 13. Mapa de las fosas exhumadas de las que el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada ha obtenido muestras óseas. Fuente: https://www.mpr.gob.es/memoriademocratica/mapa-de-fosas/Paginas/buscadorfosas.aspx

Las muestras recibidas pertenecen a un total de 1384 individuos cuya identificación es el objetivo del estudio. Los restos óseos registrados por el laboratorio son mayoritariamente huesos largos como el fémur (60,2%) y piezas dentales (22,8%). El resto de muestras son: tibia (7,8%), húmero (4,3%), radio/cúbito (1,8%), mandíbula (0,9%) y otros tipos de huesos como falanges, manubrio del esternón, clavícula, etcétera (2,1%).

De los 1384 restos óseos que han llegado al laboratorio, solo 833 se han analizado hasta el momento, debido al tiempo invertido en el proceso. El resto de muestras dubitadas se encuentran en proceso de análisis.



Gráfica 1. Porcentaje de cada tipo de muestra ósea recibida por cada fosa exhumada. Fuente propia.

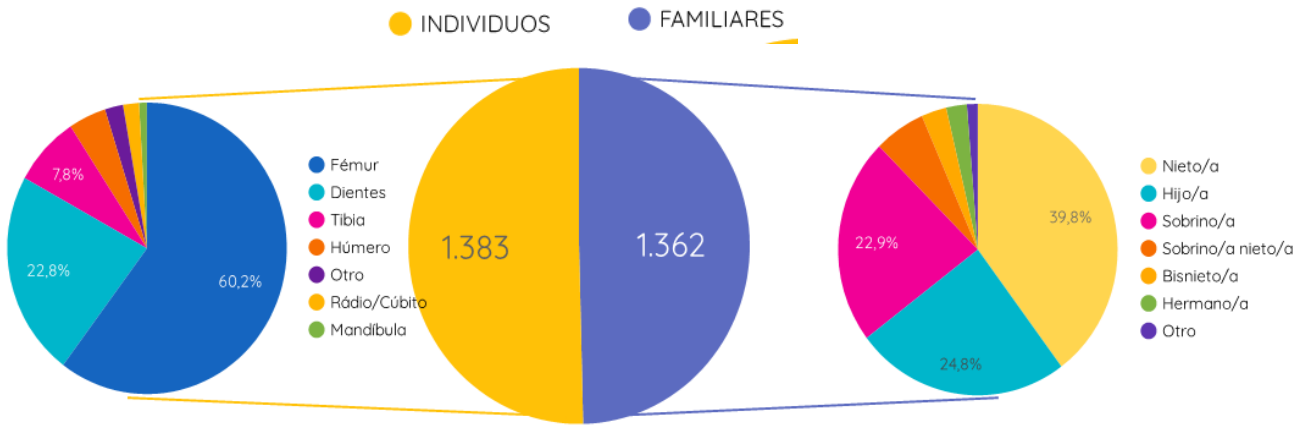
4.2 Muestras Indubitadas

Para poder cotejar y llegar a compatibilidades genéticas el Laboratorio ha obtenido muestras de referencia de 1362 familiares con un total de 1519 parentescos en relación con los individuos. La mayor parte de los familiares se corresponden con nietos/as (39,8%), seguido de hijos/as (24,8%) y sobrinos/as (22,9%).

Tabla 2.Total de familiares según su parentesco con las víctimas. Fuente propia.

PARENTESCO	TOTAL	TOTAL
Nieto/a	600	39,81 %
Hijo/a	374	24,82 %
Sobrino/a	345	22,89 %
Sobrino/a nieto/a	89	5,91 %
Bisnieto/a	44	2,92 %
Hermano/a	36	2,39 %
Otro	19	1,26 %

Las muestras indubitadas obtenidas han sido en su mayoría hisopos bucales (98,8%), contando con tan sólo 16 muestras de sangre recogida en papel especial FTA (1,2%).

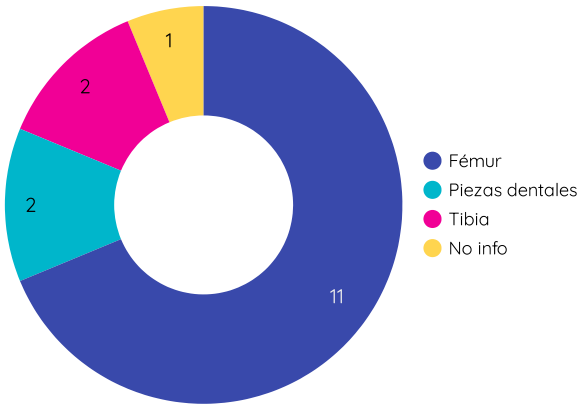


Gráfica 2. Resumen de comparación del total de muestras óseas (izquierda) y de familiares por relación de parentesco (derecha). Fuente propia.

4.3 Resultados de Identificación

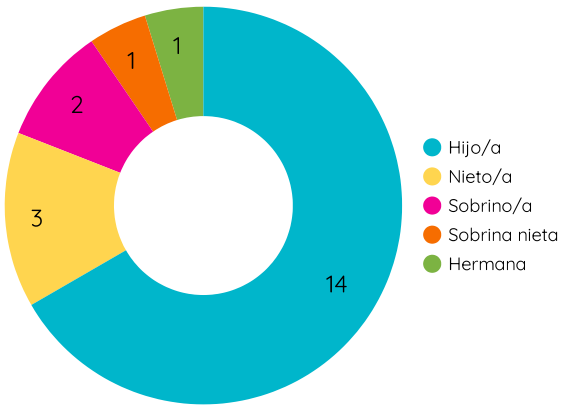
El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada ha logrado identificar, a día de hoy, a 16 individuos y establecer 21 relaciones de parentesco. Estas identificaciones no son del total de individuos sino del total de muestras dubitadas analizadas, ya que como se dice anteriormente no todas las muestras que se encuentran en el laboratorio han sido terminadas de analizar. Esto es debido a la mala conservación de los restos óseos, pero también es debido a las pocas relaciones familiares directas con las que se encuentra el laboratorio para comparar perfiles genéticos.

Las muestras óseas dubitadas a partir de las cuales se ha conseguido identificar a los 16 individuos han sido: 11 fémures (68,75%), 2 tibias (12,50%), 2 piezas dentales (12,50%) y una identificación de la que no se tiene información.



Gráfica 3. Restos óseos identificados. Fuente propia.

Las relaciones de familiaridad que se han establecido en la identificación corresponden a: 14 hijos/as, 3 nietos/as, 2 sobrinos/as, 1 sobrina nieta y 1 hermana. Como vemos, la relación con la que más éxito se tiene es padre-hijo. Pero analizando datos anteriores, solo un 24,82% de las relaciones de familiaridad que llegan al laboratorio son este tipo de parentesco, una de las razones por las cuáles se debe el número de identificaciones relativamente bajo. Un 4% aproximadamente de las relaciones padre-hijo han sido identificados.



Gráfica 4. Relaciones de parentesco establecidas con los restos óseos identificados. Fuente propia

Las técnicas de análisis de ADN empleadas para obtener perfiles genéticos de restos óseos y familiares han sido el análisis de marcadores STRs autosómicos en combinación con el análisis de marcadores STRs del cromosoma Y (10 identificaciones), seguida de únicamente el análisis de marcadores STRs (9 identificaciones) y, posteriormente, la combinación de marcadores STRs autosómicos y la secuenciación del ADN mitocondrial (1 identificación).

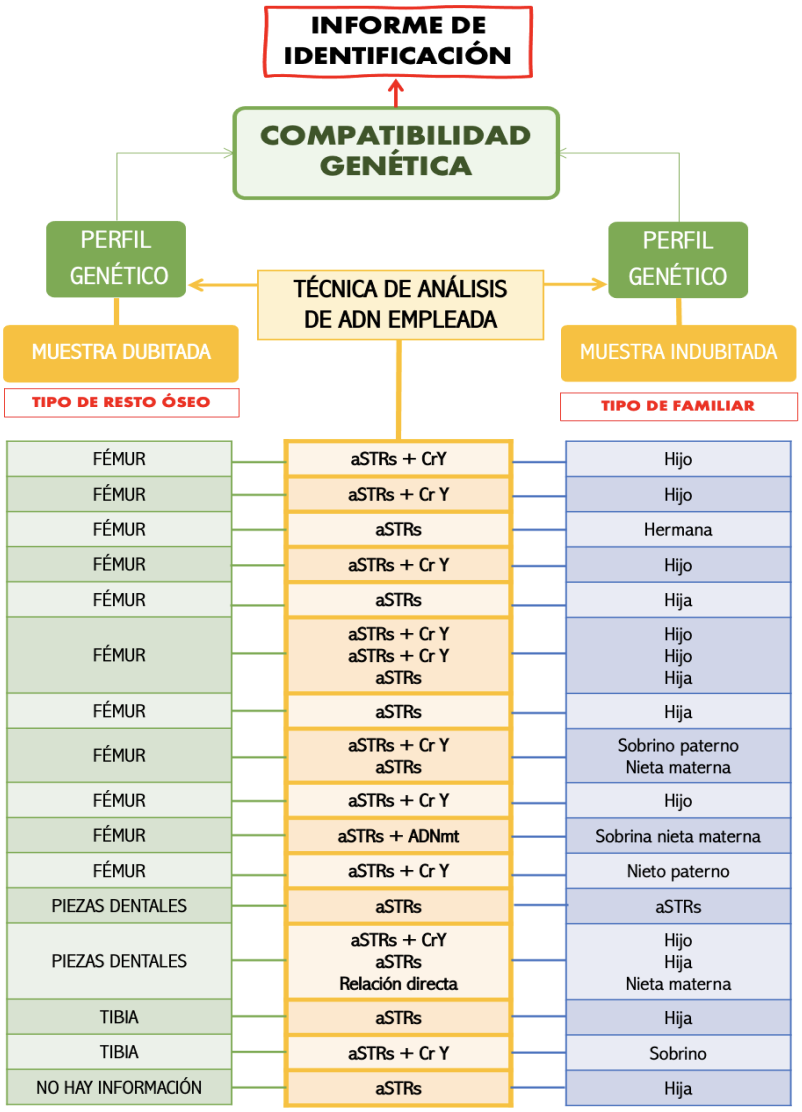


Figura 15: Técnicas empleadas por el Laboratorio en las identificaciones positivas. Fuente propia

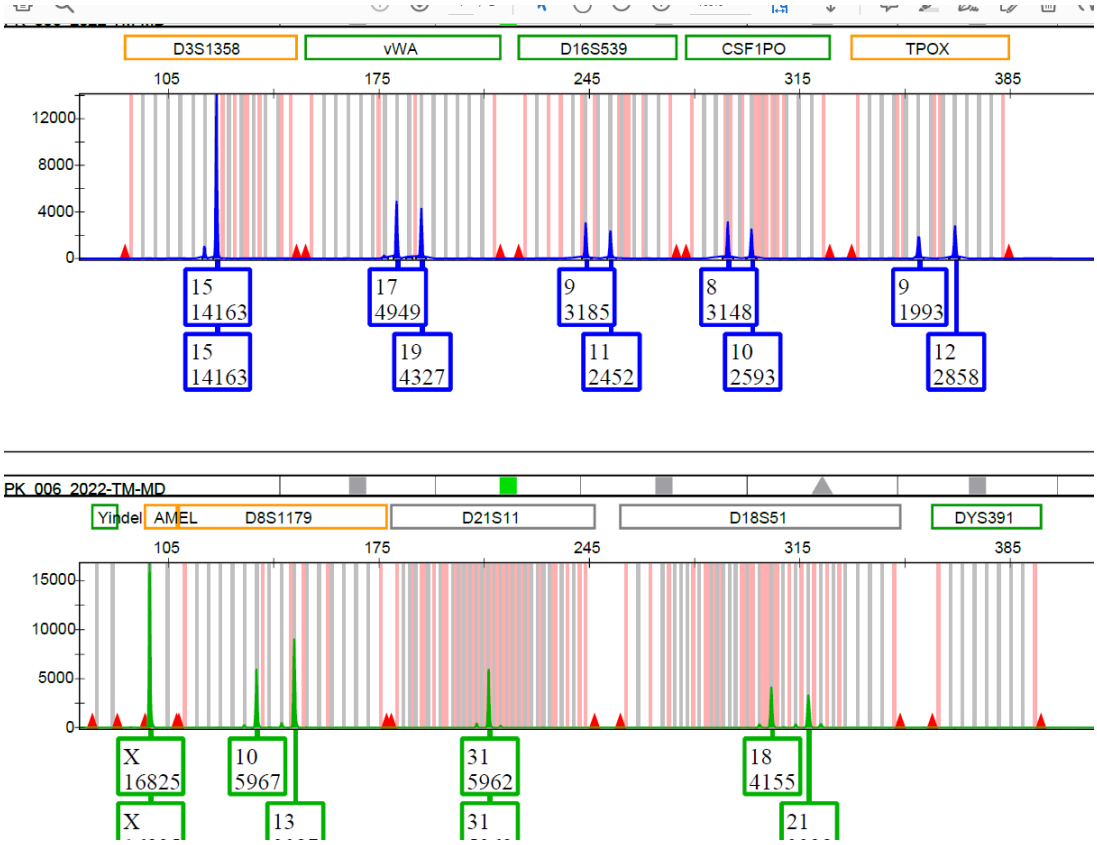


Figura 16. Electroferograma muestra A. Fuente propia

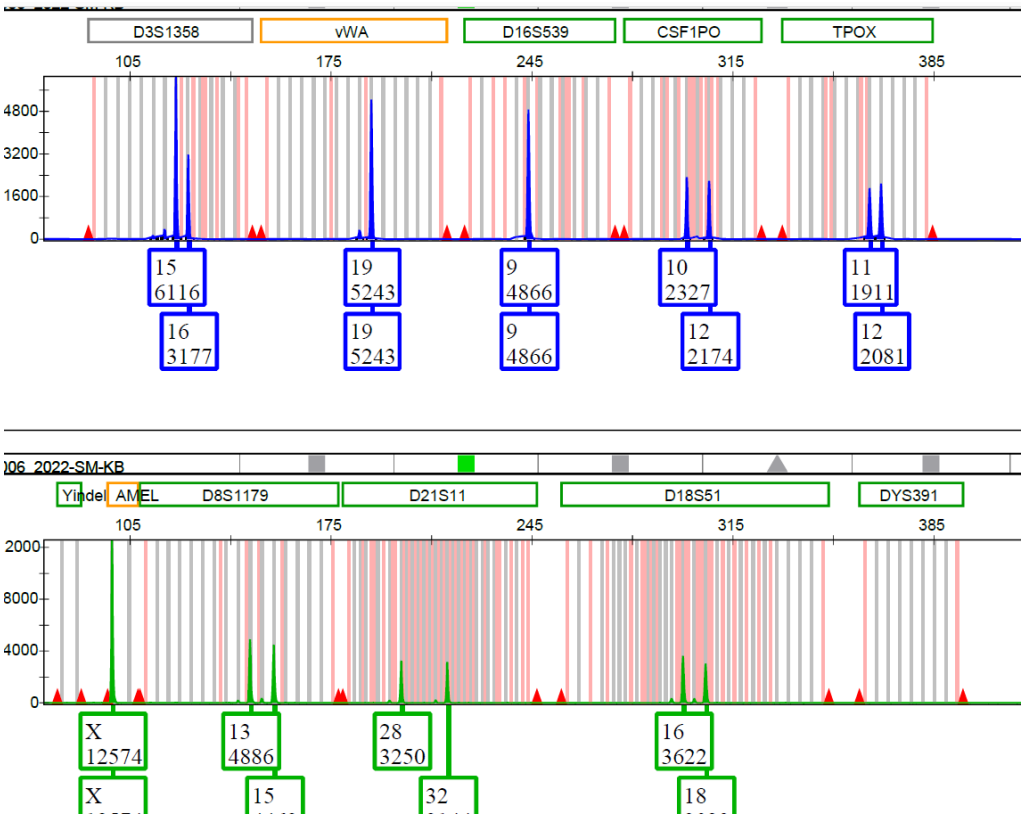


Figura 17. Electroferograma muestra B. Fuente propia

En la figura 16 y figura 17 vemos un ejemplo de identificación positiva entre las muestras A y B. Como observamos, los diferentes marcadores van incluyéndose entre las muestras A y B. Observamos que pueden ser madre e hija.

5. DISCUSIÓN

La identificación genética a partir de restos óseos supone uno de los mayores retos de la ciencia forense. Las muestras con las que trabaja el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada para la identificación de víctimas de la Guerra Civil y Posguerra española son restos óseos de más de 80 años de antigüedad y, en su mayoría, muy degradados. Sin embargo, el tejido óseo posee características físicoquímicas que favorecen la preservación del ADN y que le permiten ser una fuente fiable de material genético.

Según los resultados hallados en este trabajo y numerosos estudios, el tipo de hueso analizado y su densidad tienen relación directa con el resultado del análisis. La región cortical de los huesos largos que cargan mayor peso (como el fémur y la tibia) y la pulpa de los dientes intactos que no han sido sometidos a endodoncia son los que ofrecen mejores resultados en identificación forense (Baeta M., et al, 2015; Miloš A., et al., 2007; Higgins D., et al., 2013). Sin embargo, según otros estudios, la elección del tipo de hueso no está del todo clara (Gonzalez A., et al.,2020; Zupanc T., et al.,2021; Mundorff A., et al., 2014; Bevc TB., et al., 2021).

A partir de 1519 muestras óseas recibidas, de las que 915 eran fémures, 346 piezas dentales y 118 tibias, el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada ha conseguido identificar 16 restos (1384 individuos que han llegado al laboratorio y solo 833 se han analizado), de los cuales 11 eran fémures, 2 piezas detales y 2 tibias. Estos datos corroboran la mencionado, pero, por otro lado, hacen plantearse el reto que supone trabajar con muestras muy antiguas.

Además del problema que supone la antigüedad de las muestras, existen condiciones ambientales que provocan déficits en la calidad en las muestras y la presencia de sustancias inhibidoras de la PCR de la fase de amplificación del proceso analítico. El pH ácido, la humedad, las temperaturas cercanas a las fisiológicas y sustancias del suelo como ácidos flúvicos y húmicos dificultan o impiden el análisis de ADN.

A pesar de la baja cantidad y calidad de ADN esperable, los nuevos avances tecnológicos en cuanto a su aislamiento por sistemas automatizados, la cuantificación a tiempo real mediante qPCR, la amplificación simultánea de numerosas regiones de interés con sistemas de PCR multiplex y el análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis capilar, han permitido maximizar las precauciones al trabajar

con muestras delicadas, y obtener resultados fiables de identificación a partir de ADN antiguo.

Tanto en la actualidad como en este trabajo, el análisis de STR mediante electroforesis capilar es la base del proceso de identificación genética. Sin embargo, aunque permite la asignación alélica mediante la detección del tamaño de las diferentes secuencias de ADN de interés, no es capaz de discriminar entre fragmentos de mismo tamaño pero diferente secuencia (Aly S.M. et al., 2015). Actualmente se está trabajando en el laboratorio con la implementación de la tecnología NGS que permite a través de una pequeña cantidad de muestra, pero varias muestras juntas. Como ya hemos comentado en el trabajo, el proceso de esta tecnología se basa en la segmentación del ADN en varios fragmentos, marcaje del ADN por medio de primers o adaptadores que indican el punto de partida para la replicación, amplificación de los fragmentos de ADN marcados con adaptadores por métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa secuenciación o lectura de los fragmentos de ADN y reconstrucción de la secuencia completa por medio de secuencias de referencia y exportación a ficheros de almacenamiento de datos (Rubio S., et al., 2020). Algo muy importante en esta tecnología es la capacidad de detección de Isoalelos, es decir, alelos que se diferencian por pequeños detalles, aunque fenotípicamente son indistinguibles.

De igual manera, el desarrollo de nuevos marcadores y kits de amplificación de STRs autosómicos y del cromosoma Y, como los empleados por el Laboratorio (GlobalFilerTM e YfilerTM Plus), han permitido la identificación, hasta este momento, de 16 individuos y su relación con 21 familiares. Haciendo referencia a las técnicas de amplificación que han ofrecido resultados en este trabajo, cabe destacar que todos los parentescos determinados de sexo masculino (hijos, sobrinos y nietos) han sido establecidos gracias a la combinación de marcadores STRs autosómicos junto a los del cromosoma Y, siendo algo positivo para las muestras de individuos del sexo masculino. Para las muestras de familiares provenientes del sexo femenino se han establecido relaciones con las víctimas empleando únicamente marcadores STRs autosómicos, salvo en un caso de relación más compleja (sobrina nieta) donde se ha necesitado la secuenciación de ADN mitocondrial, siendo obligada la línea materna entre el familiar y el individuo. Como vemos, los marcadores STRs autosómicos son imprescindibles en el proceso de identificación, empleando los STRs del cromosoma Y, y el ADNmt de forma complementaria a estos en la mayoría de los casos.

Próximamente, se empiezan a probar en el laboratorio nuevos kits de marcadores autosómicos

Otro de los retos que surge en el proceso de identificación es la presencia de relaciones de familiaridad complejas. Al tratarse de víctimas de la Guerra Civil y la Posguerra española, es lógico pensar en el salto generacional que esto supone en la búsqueda de familiares, siendo en su mayoría nietos (39,81%). También hay otras relaciones como sobrino/a nietos/as (5,91%), bisnietos/as (2,92%) que dificultan la obtención de resultados positivos.

En la realización de este trabajo de investigación para el análisis de los resultados de identificación genética, se han encontrado varias limitaciones. Entre ellas, un bajo tamaño muestral de identificaciones positivas debido a la dificultad del proceso al trabajar con muestras antiguas y relaciones de familiaridad complejas. Por otro lado, existe variabilidad de técnicas y protocolos en el proceso de identificación genética entre distintos laboratorios ya que la actualización del procedimiento analítico de ADN está en constante desarrollo.

Como puntos positivos, ha sido posible acceder a la totalidad de muestras exhumadas del territorio andaluz y, por tanto, conseguir una muestra representativa. También han sido descritos los protocolos más empleados y actualizados en identificación genética, por lo que este trabajo posee alta vigencia temporal que acompaña al estado actual del tema sobre las víctimas de la Guerra Civil y Posguerra Española. Gracias a la Ley de Memoria Democrática, cada vez son más los familiares que han podido recuperar y honrar a sus seres queridos. El Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada sigue recibiendo continuamente restos óseos de las fosas que se van localizando y exhumando de los que obtener perfiles genéticos con los que cotejar y conseguir identificaciones.

Pese a que gran parte de los restos óseos ya encontrados no han podido ser aún identificados, los avances conseguidos han sido muy importantes. Se han creado bases de datos de toda la información genética conseguida para poder continuar con el objetivo último del proceso, identificar y dignificar a las víctimas de la Guerra Civil Española y Posguerra.

Por otra parte, cabe destacar la importancia de un sistema de calidad en el Laboratorio. Es importante obtener resultados con métodos que están validados. El Laboratorio de Identificación genética está en la implantación de la ISO 17025, aunque se encuentra bajo la norma ISO 9001 de laboratorios. Además, ha implantado un

software para la gestión del laboratorio Labware 8.0, el cuál ayuda a la gestión de todos los datos con los que cuenta el laboratorio.

Por último, hablar de las ventajas de la existencia de un Banco de ADN. Un gran problema que surge es la comparación de perfiles restos óseos con el de familiares, pero de una misma fosa, ya que la probabilidad de coincidencia es menor. Por ello surgió el tema del Banco de ADN, que permite la posibilidad de ampliar el número de identificaciones ya que es posible la comparación de perfiles genéticos de individuos de diferentes fosas con perfiles de familiares, también de distintas fosas.

6. CONCLUSIÓN

A partir de este Trabajo Fin de Grado concluimos los siguientes puntos:

- Analizados los datos de Perfiles Genéticos del Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada, observamos que los mejores perfiles de muestras dubitadas son los obtenidos a partir de fémur y piezas dentales.
- Las muestras, mayoritariamente de restos óseos antiguos, deben trabajarse con especial cuidado y de una manera estricta de medidas contra la contaminación. Algunas de las medidas son esterilización del laboratorio con luz ultravioleta, para eliminar restos ADN que pudiese contaminar nuestra muestra; protocolos de limpieza de material con lejía 10%, agua y etanol, usando por último un producto que pudiese eliminar cualquier resto que pudiese quedar (DNAzap) o, sistema de impulsión de aire estéril (presión positiva).
- Yo indicaría la esperanza en la implementación de nuevos procedimientos desde la elección de muestras (petroso), nuevos protocolos de extracción y kits de amplificación, así como la NGS
- Granada han permitido identificar a 16 individuos. Lo que indica dos motivos:
    - Limitaciones tanto de dificultad en el análisis de ADN inherente a las muestras de restos óseos, a la data de las mismas y a las condiciones ambientales a las que han sido sometidas
    - Limitaciones en las relaciones de parentesco habitualmente distantes que pretenden establecer.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abrego Reyes V. Fundamentos de electroforesis capilar y aplicaciones 2015. https://slideplayer.es/slide/2724400/ (accessed May 25, 2022).

Álvarez-Cubero MJ, Saiz M, Álvarez JC, Lorente JA. Nuevas aplicaciones en identificación genética. Cuadernos de Medicina Forense 2010;16:5–18.

Álvarez-Cubero MJ, Saiz M, Álvarez JC, Lorente JA. Nuevas aplicaci
ones en identificación genética. Cuadernos de Medicina Forense 2010;16:5–18.

Alvarez-Cubero MJ, Saiz M, Martinez-Gonzalez LJ, Alvarez JC, Eisenberg AJ, Budowle B, et al. Genetic identification of missing persons: DNA analysis of human remains and compromised samples. Pathobiology 2012;79:228–38.

Aly SM, Sabri DM. Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit. Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii/Archives of Forensic Medicine and Criminology 2015;65:260–71.

Amplificación del ADN: la PCR 2009. https://blogdelaboratorio.com/amplificacion-del-adn-la-pcr/ (accessed April 23, 2022).

Applied Biosystems. PrepFiler® and PrepFiler® BTA forensic DNA extraction kits. . 2012.

Baeta M, Núñez C, Cardoso S, Palencia-Madrid L, Herrasti L, Etxeberria F, et al. Digging up the recent Spanish memory: genetic identification of human remains from mass graves of the Spanish Civil War and posterior dictatorship. Forensic Science International: Genetics 2015;19:272–9.

Baeta M, Núñez C, Cardoso S, Palencia-Madrid L, Herrasti L, Etxeberria F, et al. Digging up the recent Spanish memory: genetic identification of human remains from mass graves of the Spanish Civil War and posterior dictatorship. Forensic Science International: Genetics 2015;19:272–9.

Barrio-Caballero, P. A. (2012). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. Revista Española de Medicina Legal, 39(2), 54-62.

Bevc TB, Božič L, Podovšovnik E, Zupanc T, Pajnič IZ. Intra-bone nuclear DNA variability and STR typing success in Second World War 12th thoracic vertebrae. Forensic Science International: Genetics 2021;55:102587.

Brüel, A., Christensen, E. I., Tranum-Jensen, J., Qvortrup, K., & Geneser, F. (2012). Histología (4a Edición). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Butler, J.M. (2005) Forensic DNA Typing (2ª Edición). USA: Editorial Elsevier.

Carracedo A. ADN: La genética forense y sus aplicaciones en investigación criminal. Instituto Deficiencias Forenses U de Santiago de Compostela 2013.

Carracedo Á. La variabilidad genética de los micro y minisatélites y su aplicación en medicina legal 1996.

Chegg Inc. (2022) Short Tandem Repeats: https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/short-tandem-repeats (accessed June 23, 2022).

Corona SV, Estrada MG. El ADN mitocondrial: una alternativa útil para la identificación forense n.d.

Crespillo Márquez MC, Barrio Caballero P. Genética forense: del laboratorio a los tribunales. Ediciones Díaz de Santos; 2019.

.

Dutra Corrêa, H. S., Miranda Pedro, F. L., Ricci Volpato, L. E., Machado Pereira, T., Siebert Filho, G., & Henrique Borges, Á. (2017). Foresic DNA typing from teeth using demineralized root tips. Forensic Science International, 280, 164-168.

E. M. Greytak, C. C. Moore, and S. L. Armentrout, “Genetic genealogy for coldcase and active investigations,” Forensic Sci. Int., vol. 299, pp. 103–113, 2019.

Etxeberria F. Las exhumaciones de la Guerra Civil y la dictadura franquista: 2000-2019: estado actual y recomendaciones del futuro. Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria democrática; 2020.

Genotipia. Hallan evidencias clínicas y genéticas de disfunción mitocondrial en el autismo y la discapacidad intelectual 2018. https://genotipia.com/genetica_medica_news/disfuncion-mitocondrial-autismo/ (accessed April 23, 2022).

Gobierno de España. Buscador de Fosas Memoria Democrática n.d. https://www.mpr.gob.es/memoriademocratica/mapa-de-fosas/Paginas/buscadorfosas.aspx (accessed February 18, 2022).

Gonzalez A, Cannet C, Zvénigorosky V, Geraut A, Koch G, Delabarde T, et al. The petrous bone: Ideal substrate in legal medicine? Forensic Science International: Genetics 2020;47:102305.

Graham, E. A. M. (2007). DNA reviews: Ancient DNA. Forensic Science, Medicine, and Pathology, 3(3), 221-225.

Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. Science & Justice 2013;53:433–41.

Higgins D, Austin JJ. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. Science & Justice 2013;53:433–41.

Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., & Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. Nature Reviews Genetics, 2, 353-359.

Martínez Suárez, J.A., (19 de junio de 2003). AVANCES TECNOLOGICOS EN LA IDENTIFICACION DACTILOSCOPICA. Recuperado de:

http://www.criminalistica.net/forense/index.php?option=com_content&view=article&id=3:avances-tecnologicos-en-la-identificacion-dactiloscopica&catid=20&Itemid=112. (accessed April 20, 2022).

M. Hofreiter, J. Sneberger, M. Pospisek, D. Vanek, Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA, Forensic Sci. Int. Genet. 54 (2021) 102538. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102538.

Karkar S, Alfonse LE, Grgicak CM, Lun DS. Statistical modeling of STR capillary electrophoresis signal. BMC Bioinformatics 2019;20:1–12.

Kling D, Tillmar AO, Egeland T. Familias 3–extensions and new functionality. Forensic Science International: Genetics 2014;13:121–7.

López Alarcón JJ. Detección molecular de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real 2020. https://www.estornuda.me/post/deteccion-molecular-de-cov-por-pcr (accessed April 20, 2022).

Lorente, J.A. (2004). *Un detective llamado ADN.* Madrid: Temas de Hoy.
Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RLM, Katzmarzyk C, Rizvić A, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. Croat Med J 2007;48:486.

Miloš, A., Selmanović, A., Smajlović, L., Huel, R. L. M., Cheryl Katzmarzyk, A. R., & Parsons, T. J. (2007). Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements. Croatian Medical Journal, 48(4), 486-493.

Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto de la República de Argentina. Guía de buenas prácticas para el uso de la genética forense e investigaciones sobre derechos humanos y derecho internacional humanitario. 2008.

Montiel Duarte, R. (2003). Capítulo 8. Aplicación de las técnicas de ADN antiguo en paleopatología. Problemas y perspectivas. En Paleopatología. La enfermedad no escrita (pp. 75-89). Barcelona: Masson.

Mundorff A, Davoren JM. Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. Forensic Science International: Genetics 2014;8:55–63.

Núñez Domingo C, Martínez-Jarreta B, Martínez de Pancorbo Gómez M de los Á. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales en la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza, 2011.

Núñez Domingo C, Martínez-Jarreta B, Martínez de Pancorbo Gómez M de los Á. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales en la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza, 2011.

Oliva ST. Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. Offarm: Farmacia y Sociedad 2002;21:122–6.

Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet 2005;6:165–83.

Pevsner, J. (2009). Bioinformatics and Functional Genomics (2a Edición). New Jersey: Wiley-Blackwel.

Rubio, Santiago; Pacheco-Orozco, Rafael Adrián; Milena Gómez, Ana; Perdomo, Sandra & García-Robles, Reggie (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Universitas Medica, 61(2).

Saiz M, Haarkötter C, Galvez X, Martinez-Gonzalez L, Medina-Lozano MI, Álvarez JC. DNA isolation from human remains. Handbook of DNA Profiling, Springer; 2021, p. 1–17.

Saiz M, Haarkötter C, Galvez X, Martinez-Gonzalez L, Medina-Lozano MI, Álvarez JC. DNA isolation from human remains. Handbook of DNA Profiling, Springer; 2021, p. 1–17.

Scientific TF. GlobalFilerTM PCR Amplification Kit User Guide. Revision E 2016:1–166.

Silva-Zolezzi, Irma. (2011). Genómica y medicina. Educación Química. 22. 15-27. 10.1016/S0187-893X(18)30109-5.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. Biol Reprod 2000;63:582–90.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. Nature 1999;402:371–2.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. Biol Reprod 2000;63:582–90.

S. Behjati, P.S. Tarpey, What is next generation sequencing?, Arch. Dis. Child. - Educ. Pract. 98 (2013) 236–238. https://doi.org/10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304340.

Thermo fisher scientific. Aspectos básicos de la PCR en tiempo real. https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html#1. Fecha de acceso 07/03, 2020.

Thermo fisher scientific. GlobalFiler™ PCR amplification kit (1,000 reactions). Referencia rápida (Applied Systems). 2018.

Thermo fisher scientific. PrepFiler express™ and PrepFiler express BTA™ forensic DNA extraction kits. 2010.

W.F. H C Crick, Molecular Structl,lre of Deoxypentose Nucleic Acids, Astbury, W. “1.”., Syrnp. Soc. Exp. BioI. I, Nucleic Acid. 171 (1953) 192.

Zupanc T, Podovšovnik E, Obal M, Pajnič IZ. High DNA yield from metatarsal and metacarpal bones from Slovenian Second World War skeletal remains. Forensic Science International: Genetics 2021;51:102426.

ANEXO I.

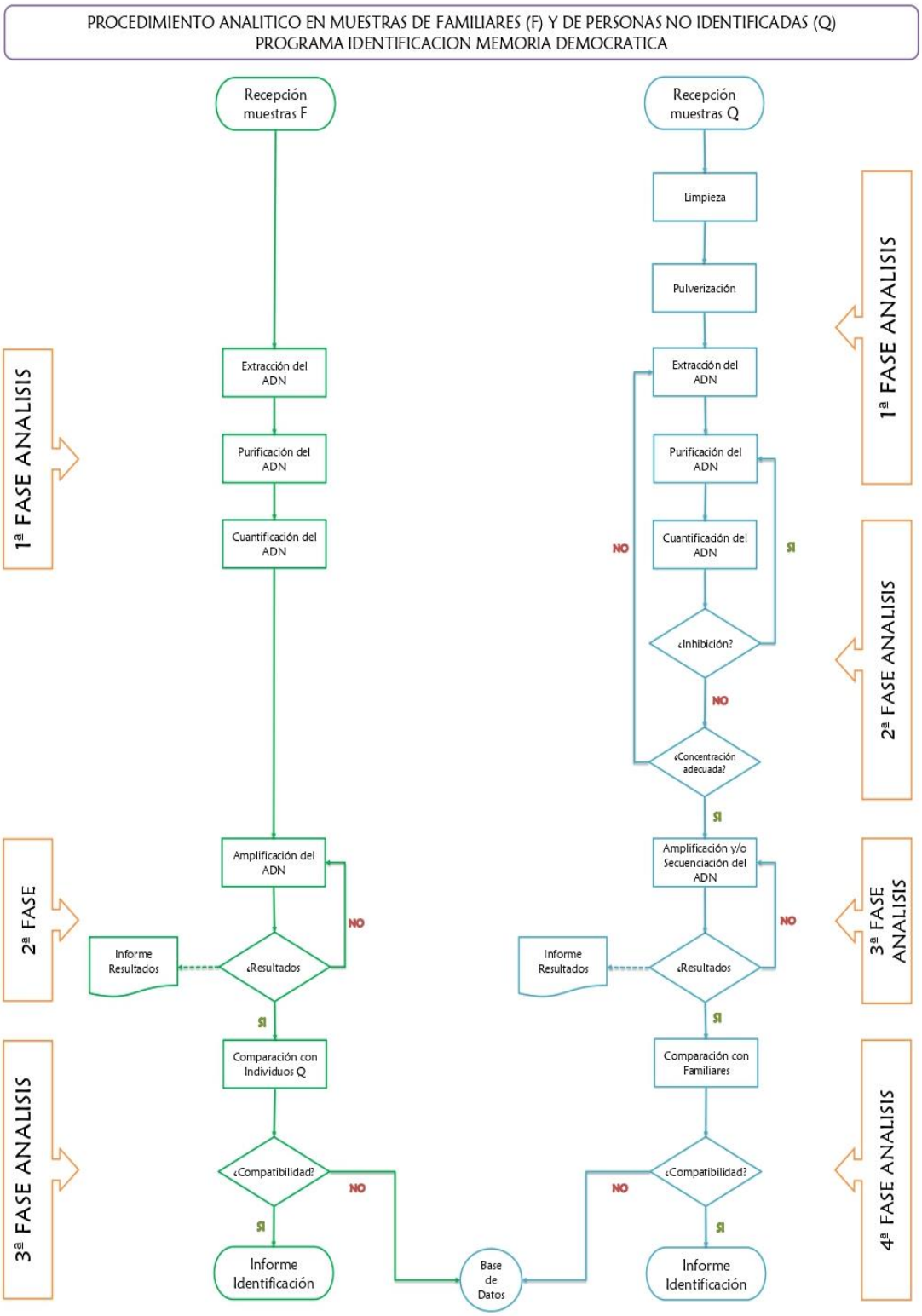


Figura 13: Diagrama de flujo de los procedimientos de ambos protocolos. Fuente: Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada.