

METODOLOGÍAS MODERNAS PARA EL ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE ADN EN ESCENARIOS FORENSES ADVERSOS

MODERN METHODOLOGIES FOR DNA ANALYSIS AND RECOVERY IN ADVERSE FORENSIC SCENARIOS

Redondo Hernández J.
Grado en Medicina.
Universitat de València.
España.

Correspondencia: Javierredondohernandez14@gmail.com

Resumen: La ciencia forense ha experimentado avances significativos en las últimas décadas, con nuevas metodologías que han revolucionado el análisis de ADN en condiciones adversas. El uso de tecnologías innovadoras, como la secuenciación de nueva generación (NGS), los microhaplotipos y los marcadores epigenéticos, ha permitido obtener perfiles genéticos más precisos incluso en muestras degradadas o contaminadas. Sin embargo, a pesar de estos avances, los métodos tradicionales siguen siendo ampliamente utilizados, a menudo limitados por su capacidad para trabajar con muestras comprometidas. Este estudio tiene como objetivo realizar una revisión exhaustiva de los avances más recientes en el análisis de ADN forense, enfocándose en la identificación y perfilado genético en escenarios complejos, como restos humanos degradados y casos de agresión sexual. El interés de esta investigación radica en la comparación entre las tecnologías emergentes y los métodos convencionales, con el fin de identificar las ventajas y limitaciones de cada uno, así como explorar áreas de mejora en la implementación de las nuevas metodologías. Además, se analizan las aplicaciones prácticas de estas técnicas en casos de estudio reales, con especial énfasis en su impacto en la resolución de casos complejos.

Los resultados obtenidos destacan que las metodologías modernas superan de manera significativa las limitaciones de los métodos tradicionales, especialmente en situaciones en las que las muestras están gravemente degradadas o contaminadas. No obstante, se identifican desafíos en términos de costos y requerimientos infraestructurales para su implementación en entornos forenses convencionales. A pesar de ello, se observan claras ventajas en la capacidad de análisis que estas nuevas tecnologías brindan. A partir de la revisión de estas metodologías, se proponen mejoras en la optimización del manejo de datos y la integración de estos enfoques en protocolos estandarizados. En conclusión, este estudio subraya la importancia crítica de las metodologías modernas en la ciencia forense y su capacidad para transformar la resolución de casos complejos, abriendo nuevas posibilidades en el campo de la genética forense.

Palabras clave: ADN forense, ADN degradado, métodos de extracción de ADN, agresión sexual, secuenciación de nueva generación (NGS), microhaplotipos, marcadores epigenéticos, técnicas forenses avanzadas, identificación genética, restos humanos degradados, perfilado genético, muestras contaminadas.

Abstract: Forensic science has made significant advancements in recent decades, with novel methodologies revolutionizing DNA analysis under challenging conditions. The adoption of innovative technologies, such as next-generation sequencing (NGS), microhaplotypes, and epigenetic markers, has enabled the generation of more precise genetic profiles, even from degraded or contaminated samples. However, despite these innovations, traditional methods continue to be widely used, often limited by their inability to effectively analyze compromised samples. This study provides a comprehensive review of the recent advances in forensic DNA analysis, with a focus on genetic identification and profiling in complex scenarios, including degraded human remains and sexual assault cases. The primary objective of this research is to compare emerging technologies with conventional methods, highlighting the strengths and limitations of each, and to explore potential areas for improving the implementation of new methodologies. Furthermore, the practical applications of these techniques in real-world case studies are examined, with particular emphasis on their impact on solving complex forensic cases.

The results underscore that modern methodologies substantially overcome the limitations of traditional methods, particularly in situations involving highly degraded or contaminated samples. Nevertheless, challenges related to costs and infrastructural requirements for their implementation in conventional forensic settings are identified. Despite these challenges, the enhanced analytical capabilities offered by these new technologies are evident. Based on the review, recommendations for improving data management optimization and integrating these methodologies into standardized protocols are proposed. In conclusion, this study highlights the critical role of modern methodologies in forensic science, emphasizing their potential to transform the resolution of complex cases and pave the way for new developments in forensic genetics.

Keywords: forensic DNA, degraded DNA, DNA extraction methods, sexual assault, next-generation sequencing, microhaplotypes, epigenetic markers, advanced forensic techniques, genetic identification, degraded human remains, genetic profiling, contaminated samples.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología forense e identificación de fluidos corporales

La identificación de fluidos corporales sigue siendo uno de los pilares fundamentales en la investigación forense. La detección de sangre, saliva o semen en una escena del crimen puede ofrecer información crucial sobre lo que ocurrió. Tradicionalmente, se han utilizado pruebas químicas e inmunológicas para identificar estos fluidos, pero los avances en las técnicas moleculares han dado un paso más allá. La base conceptual de estos primeros apartados de introducción toma como referencia principal lo documentado por Bazzyar en su investigación de 2023 (1). Hoy en día, no solo es posible identificar estos fluidos con mayor precisión, sino que además se puede hacer con cantidades mínimas de muestra, algo impensable hace unos años.

Las nuevas técnicas moleculares utilizan marcadores específicos que permiten identificar fluidos corporales, incluso en situaciones complicadas, donde las muestras están degradadas o alteradas por el entorno (2). Esto ha revolucionado el trabajo de los laboratorios forenses, especialmente en casos donde la cantidad de ADN es limitada, aportando una fiabilidad y precisión que son claves en la resolución de crímenes.

1.2 Metodologías modernas para la identificación de sangre en escenarios forenses adversos

1.2.1 Pruebas presuntivas

En escenarios forenses adversos, las pruebas presuntivas son la primera aproximación para detectar sangre. Las pruebas catalíticas, como el luminol, emiten luz al reaccionar con la hemoglobina, revelando manchas invisibles o degradadas con rapidez y fiabilidad. Además, las fuentes de luz alternativas (ALS) como la Polilight® permiten detectar manchas sin reacciones químicas, útiles cuando las muestras están expuestas a factores ambientales como la luz UV o el calor, que comprometen la eficacia de otras pruebas.

1.2.2 Pruebas confirmatorias

Para asegurar la presencia de sangre, las pruebas confirmatorias, como HemaTrace® y RSID, usan anticuerpos específicos que evitan falsos positivos, especialmente en muestras mezcladas con otros fluidos corporales. En escenarios donde la sangre está degradada, los análisis de mRNA han demostrado ser efectivos, recuperando información genética de manchas secas con hasta 15 años de antigüedad.

1.3 Metodologías modernas para la detección y análisis de semen en escenarios forenses adversos

La identificación precisa de semen sigue siendo fundamental en la ciencia forense, especialmente en casos de delitos sexuales, donde las muestras suelen estar degradadas o contaminadas. Diversas pruebas presuntivas y confirmatorias garantizan la viabilidad de estas muestras y optimizan la extracción de ADN.

1.3.1 Pruebas presuntivas

Las fuentes de luz alternativa (ALS), como la luz UV y Polilight®, son herramientas no destructivas clave para detectar semen. Tecnologías sensibles, como el Blue-maxx™, también permiten identificar rastros mínimos, reduciendo los falsos positivos que ciertas fuentes como la lámpara de Wood podrían generar.

La prueba de fosfatasa ácida seminal (SAP) es la más reconocida para detectar semen, ofreciendo una indicación rápida mediante un cambio de color en el reactivo, aunque la fosfatasa ácida vaginal puede provocar falsos positivos. Otra técnica menos común, la microscopía electrónica de barrido (SEM), detecta elementos específicos del semen, como el fósforo, y resulta útil en casos de deterioro extremo o cuando el sustrato interfiere con otras pruebas.

1.3.2 Pruebas confirmatorias

Las pruebas confirmatorias son esenciales para asegurar que las muestras sean aptas para el análisis de ADN. La tinción de árbol de Navidad es ampliamente aceptada, tiñendo los núcleos de los espermatozoides de rojo y sus colas de verde, lo cual proporciona una confirmación visual incluso en muestras expuestas a condiciones adversas.

La detección del antígeno prostático específico (PSA) mediante kits como Biosign® PSA presenta limitaciones importantes, como falsos positivos en sudor y orina de hombres con cáncer de próstata, así como en mujeres con síndrome de Down o bajo ciertos tratamientos anticonceptivos, lo que compromete su fiabilidad en comparación con otros marcadores como el de hemoglobina.

En cuanto a la semenogelina, anteriormente utilizada en pruebas inmunocromatográficas (RSID™-semen) para identificar semen, su uso ha sido descartado debido a su detección en otros tejidos, como la retina, lo que invalida su especificidad en análisis forenses.

Por otro lado, los marcadores de mRNA, como Protamina 1 (PRM1), representan una alternativa más robusta y específica para la detección de semen en muestras degradadas, ofreciendo una solución eficiente en escenarios forenses adversos.

1.4 Metodologías modernas para la detección y análisis de saliva en escenarios forenses adversos

La saliva es un fluido biológico clave en ciencias forenses, especialmente cuando no se dispone de otras fuentes de ADN. En escenarios adversos, donde las muestras pueden estar contaminadas o degradadas, las pruebas presuntivas y confirmatorias son cruciales para obtener ADN de calidad.

1.4.1 Pruebas presuntivas

ALS, como la luz UV y Polilight®, permiten detectar manchas de saliva que adquieren un tono azulado o blanquecino. Sin embargo, debido a la falta de partículas sólidas, es difícil diferenciarla de otros fluidos. Tecnologías como el Lumatec®superlite 400 ayudan a detectar saliva en condiciones variadas, aunque su eficacia es limitada en superficies complejas.

Entre las pruebas enzimáticas, destacan la prueba de yodo-almidón, que detecta amilasa en saliva mediante un cambio de color en presencia de yodo, aunque puede generar falsos positivos. La prueba de Phadebas, que emplea almidón ligado a un tinte, permite una detección cualitativa y cuantitativa de amilasa, aunque también puede verse afectada por interferencias de detergentes o cremas.

El RSID™-Saliva utiliza anticuerpos monoclonales específicos para la amilasa salival, con capacidad para detectar volúmenes tan pequeños como 1 µL. Sin embargo, presenta la especificidad más baja entre los kits RSID™, y estudios recientes han demostrado reacciones positivas a diversos fluidos biológicos, lo que limita su utilidad como herramienta confirmatoria. Por tanto, debe considerarse únicamente como una prueba presuntiva.

1.4.2 Pruebas confirmatorias

Los marcadores de mRNA, como STATH y HTN3, ofrecen una detección precisa de saliva en muestras degradadas mediante RT-PCR.

La microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX) facilita la identificación de elementos como potasio y fósforo en saliva, útil cuando las pruebas convencionales fallan. La espectroscopía de fluorescencia también resulta efectiva en la detección de saliva disuelta en solución de cloruro de potasio, siendo útil para manchas secas de larga data.

1.5 Implicaciones en la metodología forense moderna para la obtención de ADN

En contextos forenses complejos, la combinación de pruebas presuntivas rápidas con confirmatorias precisas y técnicas avanzadas optimiza la obtención de ADN en muestras de sangre, semen y saliva, garantizando su idoneidad para el análisis forense. Estas metodologías maximizan la fiabilidad de la evidencia biológica, incluso en escenarios adversos como investigaciones de delitos sexuales o agresiones físicas. Tecnologías avanzadas, como la microscopía electrónica y

la espectroscopía UV-Vis, refuerzan la precisión en casos de degradación, asegurando la obtención de perfiles genéticos concluyentes cuando otras pruebas tradicionales pueden fallar.

1.6 Aplicaciones Forenses de la Tecnología Microfluídica

El análisis forense de fluidos biológicos, como sangre, semen y saliva, comienza con pruebas presuntivas y confirmatorias. Sin embargo, los métodos tradicionales pueden ser lentos y, en algunos casos, afectar la integridad de la evidencia. Los microdispositivos de papel (μ PADs) ofrecen una alternativa rápida y portátil, permitiendo la detección simultánea de varios fluidos en apenas 10-15 minutos y manteniendo su precisión incluso tras semanas de almacenamiento.

1.6.1 Tipificación genética y perfil de ADN

La tecnología microfluídica ha optimizado la tipificación genética mediante sistemas automatizados. Un avance importante es la extracción en fase sólida (SPE) en microchips utilizando perlas de sílice magnéticas, este hallazgo permite recuperar más del 65% del ADN en muestras pequeñas, como 0,6 μ L de sangre. Esto resulta de gran valor en escenarios donde las muestras están degradadas o son muy limitadas.

IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE	
PRUEBAS PRESUNTIVAS	
Luminol	Emite luminiscencia al reaccionar con Hb
Polilight	No utiliza productos químicos, no modifica calidad de la muestra
PRUEBAS CONFIRMATORIAS	
HemaTrace y RSID	Uso de anticuerpos específicos, evita falsos positivos
mRNA	Uso de RT-PCR, detecta sangre en muestras secas de hasta 15 años de antigüedad
IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN	
PRUEBAS PRESUNTIVAS	
Polilight	Herramienta que respeta la calidad de la muestra
Lámpara de Wood	Uso de luz UV
Filtro Blue-Max	Aumenta la sensibilidad aplicado a la lámpara de Wood, disminuye posibles falsos positivos
Fosfatasa ácida seminal (SAP)	Viraje colorimétrico, puede dar lugar a falsos positivos por presencia de fosfatasa ácida vaginal (VAP)
Microscopia óptica de barrido (SEM)	Detecta fósforo presente en muestras de semen, útil en casos de deterioro extremo o cuando hay un sustrato que interfiere con la muestra
PRUEBAS CONFIRMATORIAS	
Tinción árbol de Navidad	Diferencia espermatozoides, tiñendo el núcleo (rojo) y la cola (verde)
mRNA	Uso de RT-PCR, detecta PRM1 específica de semen, solución eficiente en escenarios adversos
PRUEBAS ACTUALMENTE INVALIDADAS EN ANÁLISIS FORENSE	
Antígeno prostático específico (PSA)	Presenta limitaciones importantes, dando falsos positivos en casos de cáncer de próstata, tratamientos anticonceptivos o pacientes mujeres con síndrome de Down
Semenogelina	Anteriormente usada en RSID-Semen. Puede estar presente en la retina por lo que queda descartada
IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA	
PRUEBAS PRESUNTIVAS	
Polilight y UV	Fuentes de luz alternativa, muestras de saliva adquieren tonalidad azulada blanquecina
Lumatec Superlite 400	Capaz de detectar saliva en condiciones variadas
Yodo- Almidón	Prueba enzimática, detecta amilasa dado el viraje en presencia de yodo
Técnica de Phaedas	Mediante tinción ligada a almidón detecta amilasa (cuantitativa / cualitativa)
RSID SALIVA	Uso de anticuerpos monoclonales, es presuntiva dada la cantidad de casos falsos positivos detectados
PRUEBAS CONFIRMATORIAS	

mRNA	Uso de RT-PCR, detecta STATH y HTN3 presente en saliva con precisión
SEM	Detección de potasio y fósforo presente en muestras de saliva
Espectroscopia de fluorescencia	Detección de saliva diluida en cloruro potásico, útil en muestras antiguas

Tabla 1. Resumen de metodología moderna para detección y análisis de muestras biológicas en escenarios forenses adversos. Elaboración propia.

1.6.2 Lisis celular y amplificación por PCR

En la lisis celular, las estructuras integradas en los canales microfluídicos rompen las membranas sin necesidad de usar productos químicos agresivos, reduciendo el riesgo de degradación del ADN. En la amplificación por PCR, la tecnología microfluídica ha facilitado avances como la PCR en flujo continuo, que reduce los tiempos de reacción, y la PCR en gotas, que optimiza la mezcla de reactivos y minimiza la contaminación cruzada.

1.6.3 Electroforesis en microchips y detección de ADN

De acuerdo con lo señalado por Bazayr, la electroforesis en microchips (ME) permite la separación y detección de fragmentos de ADN hasta 100 veces más rápido que la electroforesis capilar convencional, generando perfiles completos en menos de 4 horas. Aunque la integración total de sistemas en un único chip sigue siendo un reto, los avances sugieren que la tecnología microfluídica seguirá mejorando la precisión y velocidad en el análisis de ADN forense.

1.7 La PCR en ciencias forenses: avances y limitaciones

El ADN humano contiene regiones polimórficas con secuencias repetitivas altamente variables entre individuos, conocidas como repeticiones en tándem, en las cuales se encuentran los VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) y los STRs (Short Tandem Repeats). Los VNTRs comprenden unidades de 10 a 100 pares de bases (bp), mientras que los STRs, con unidades de 2 a 6 bp. Se encuentran distribuidos extensamente en el genoma, facilitando el análisis y la creación de perfiles genéticos en estudios forenses.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descubierta en 1986 por Kary Mullis y documentado en estudios recientes (3), transformó el análisis de ADN en ciencia forense al permitir la amplificación de muestras mínimas. Este avance consolidó el uso de STR autosómicos (A-STRs) en sistemas de identificación y facilitó la creación de bases de datos genéticas, esenciales para identificar individuos y vincularlos a escenas del crimen.

No obstante, la PCR enfrenta limitaciones en muestras de ADN degradado o contaminado, donde las condiciones ambientales extremas fragmentan el ADN, y los inhibidores interfieren con la amplificación. En estos casos, la secuenciación de nueva generación (NGS) surge como una alternativa más precisa y sensible, permitiendo un análisis más detallado cuando la PCR convencional no ofrece resultados satisfactorios.

Los loci STR se clasifican en tres tipos según su estructura de repeticiones:

- Simples: repeticiones idénticas en longitud y secuencia.
- Compuestos: bloques adyacentes de repeticiones con secuencias idénticas o diferentes.
- Complejos: repeticiones de diversas longitudes y secuencias, a veces con secuencias adicionales entre bloques.

La amplificación múltiple de STRs permite el análisis simultáneo de varios loci en una sola reacción, agilizando la identificación en estudios forenses. Además de los STRs, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) ofrecen una alternativa en casos de ADN altamente degradado. Los SNPs, aunque con menor poder discriminativo que los STRs, son eficaces en condiciones de ADN fragmentado, ofreciendo viabilidad en escenarios forenses complejos (3,4).

2. JUSTIFICACIÓN

La revisión aborda los avances en la identificación de ADN en ciencias forenses, destacando la importancia de incorporar técnicas avanzadas que mejoren la precisión y confiabilidad en el análisis genético, especialmente en

escenarios adversos donde las muestras suelen estar degradadas o contaminadas. El trabajo tiene gran relevancia para el ámbito forense, ya que las metodologías tradicionales de análisis de ADN enfrentan limitaciones en condiciones complejas, lo que puede comprometer tanto la cantidad como la calidad de las pruebas obtenidas en investigaciones criminales.

El ADN es una herramienta fundamental en la identificación forense, y los recientes avances tecnológicos, como la secuenciación de nueva generación (NGS), los microhaplotipos y los marcadores epigenéticos, han permitido un nivel de precisión antes inalcanzable. Estas tecnologías ofrecen una solución a problemas en la identificación genética en escenarios complicados, como en el análisis de restos humanos severamente degradados y en contextos de agresiones sexuales. Comprender y aplicar estas innovaciones permite al campo forense responder eficazmente en situaciones donde el ADN convencional podría no ser viable, aumentando así la solidez y aplicabilidad de la genética forense en casos judiciales complejos.

La relevancia de esta revisión radica en la necesidad de entender y documentar cómo estos avances pueden optimizar la precisión del análisis de ADN, promoviendo una adaptación práctica de estas metodologías en casos forenses. Si bien las técnicas tradicionales cumplen un rol esencial, los métodos avanzados presentan mejoras significativas en términos de sensibilidad y precisión, especialmente en condiciones en las que el ADN está deteriorado o en cantidades mínimas. Este trabajo explora una laguna existente en la literatura forense, donde se requiere una evaluación comparativa de estas técnicas para garantizar que los laboratorios forenses adopten protocolos más efectivos y adaptados a los desafíos actuales.

La contribución de esta revisión es doble. En el ámbito científico, proporciona una revisión sobre las tecnologías emergentes en genética forense y su impacto en la identificación de individuos. A nivel práctico, sugiere el desarrollo de prácticas estandarizadas que incluyan estas técnicas avanzadas, asegurando que los resultados de las investigaciones sean reproducibles en cualquier entorno judicial. Al explorar y consolidar estos avances, el estudio apoya la transición hacia un enfoque forense moderno y estandarizado, capaz de responder con eficacia a la demanda creciente de métodos de identificación precisos en escenarios adversos.

3. OBJETIVOS

1. Examinar y sintetizar los avances tecnológicos en el análisis de ADN forense, con especial énfasis en metodologías de identificación y perfilado genético en condiciones adversas.

2. Comparar la eficacia de nuevas técnicas de análisis de ADN en distintos contextos forenses, evaluando ventajas y limitaciones frente a los métodos tradicionales.

3. Identificar áreas de mejora en la implementación de nuevas tecnologías, proponiendo enfoques que optimicen la obtención de perfiles genéticos fiables.

4. Explorar aplicaciones prácticas de estos métodos en casos de estudio, analizando su impacto en la resolución de casos complejos y su contribución a la ciencia forense moderna.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Búsqueda bibliográfica

La búsqueda bibliográfica se diseñó con el objetivo de evaluar los avances en las metodologías de análisis y recuperación de ADN en contextos forenses, enfocándose especialmente en escenarios donde las muestras presentan degradación o contaminación.

Para la obtención del material bibliográfico, se llevaron a cabo búsquedas en diversas bases de datos electrónicas, incluyendo PubMed, SpringerLink, SpringerNature, Elsevier, MDPI, Oxford University Press, Journal of Zhejiang University Science B y Frontiers in Genetics.

Cabe mencionar que, aunque se identificaron varios artículos de gran interés en Wiley Online Library, estos tuvieron que ser descartados debido a que no cumplían con el requisito de acceso gratuito o asociado a la Universitat de València.

En una primera búsqueda, se introdujeron en las bases de datos las palabras clave “Forensic DNA”, obteniendo un total de 72,711 resultados. Utilizando el buscador avanzado, se emplearon los operadores “AND” y “OR” para construir la siguiente secuencia:

((((((((((((Forensic DNA) OR (Forensic DNA)) AND (degraded DNA)) OR (Forensic DNA)) AND (extraction methods)) OR (Forensic DNA)) AND (challenging environments)) OR (Forensic DNA)) AND (environmental DNA degradation)) OR (Forensic Samples)) OR (Forensic Samples)) AND (Sexual assault)) OR (Advanced forensic techniques)) OR (Advanced forensic techniques)) AND (DNA).

Esta búsqueda resultó en un total de 754 artículos.

4.2 Criterios de inclusión / exclusión

Categoría	Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Acceso	Artículos de acceso gratuito o disponibles a través de la suscripción de la Universidad de Valencia.	Artículos sin acceso disponible o restringidos sin posibilidad de acceso mediante la Universidad de Valencia.
Fecha de publicación	Últimos 5 años	Artículos anteriores al año 2020
Tipo de estudio	Artículos originales, revisiones sistemáticas, metaanálisis y estudios experimentales sobre análisis de ADN en entornos forenses y metodologías modernas de extracción.	Editoriales, comentarios y estudios sin evidencia científica.
Contexto	Investigaciones en escenarios forenses reales o simulados, como escenas de crimen y ambientes complejos.	Análisis de ADN en áreas no forenses, como estudios médicos, genéticos o agrícolas.
Calidad y Tipo de Muestra	Estudios con metodologías validadas, que empleen muestras relevantes en criminalística.	Estudios con metodologías imprecisas, muestras insuficientes o sin resultados concluyentes.

Tabla 2. Resumen de los criterios de inclusión y exclusión por categorías. Elaboración propia.

4.3 Diagrama de flujo

De acuerdo con la metodología establecida, se identificaron inicialmente 72,711 publicaciones. Tras la aplicación de operadores avanzados de búsqueda, el conjunto se redujo a 754 artículos. Posteriormente, se implementó el criterio de inclusión de antigüedad máxima de 5 años, lo que resultó en 256 publicaciones. A continuación, se aplicaron el resto de los criterios detallados en la tabla 2, eliminando los duplicados y seleccionando aquellos artículos con acceso gratuito o disponible a través de la Universitat de Valencia, obteniéndose un total de 70 artículos. De estos, 56 fueron seleccionados tras la evaluación de sus resúmenes. Finalmente, mediante una lectura exhaustiva y crítica, se descartaron 14 artículos, quedando una inclusión final de 42 artículos de revisión (Figura 1).

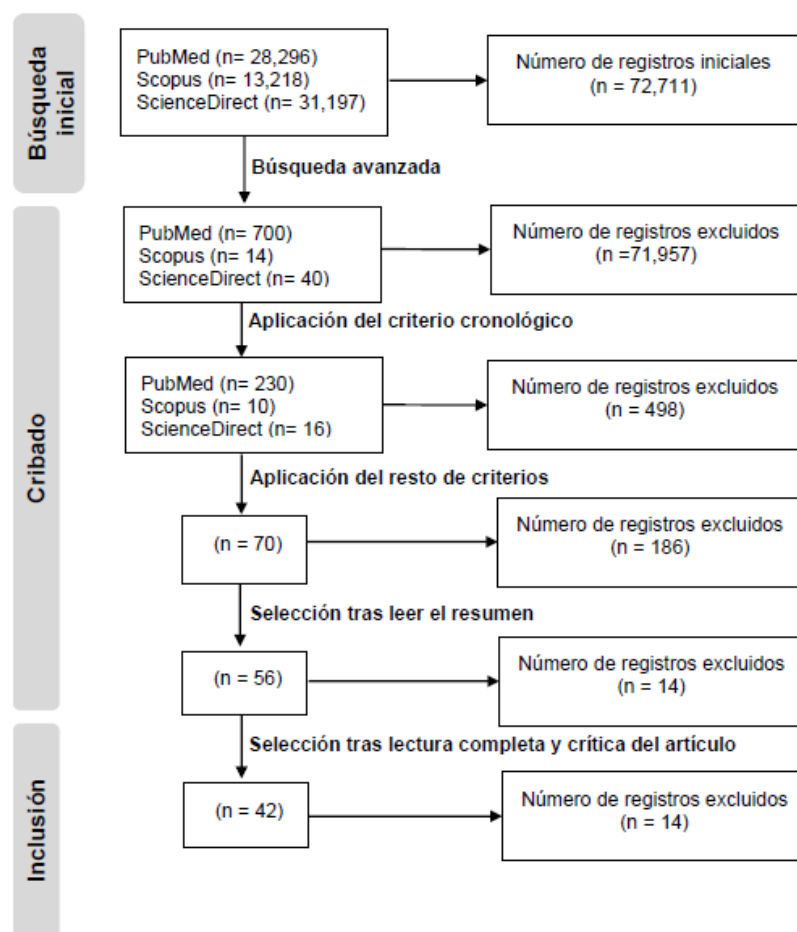


Figura 1. Flujograma de búsqueda bibliográfica. Elaboración propia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación (NGS) o secuenciación masiva paralela (MPS), ha revolucionado la tipificación de ADN en biología forense. A diferencia de los métodos tradicionales que solo permiten la lectura de STRs (repeticiones cortas en tándem), la NGS permite la secuenciación simultánea de múltiples regiones del ADN, incluyendo las regiones flanqueantes de los STRs, que contienen variaciones genéticas adicionales para mejorar la discriminación (Figura 2A / 2B). Esta técnica es particularmente útil cuando el ADN está degradado o se trata de mezclas muy heterogéneas (5), situaciones comunes en el análisis forense.

La MPS, a diferencia de la electroforesis capilar (CE), permite analizar varias regiones del ADN simultáneamente, proporcionando una mayor cantidad de información genética que los métodos tradicionales. Hölzl-Müller destacó en 2021 que la MPS tiene una concordancia del 99.98% con los métodos tradicionales de CE, lo que respalda su validez en contextos forenses.

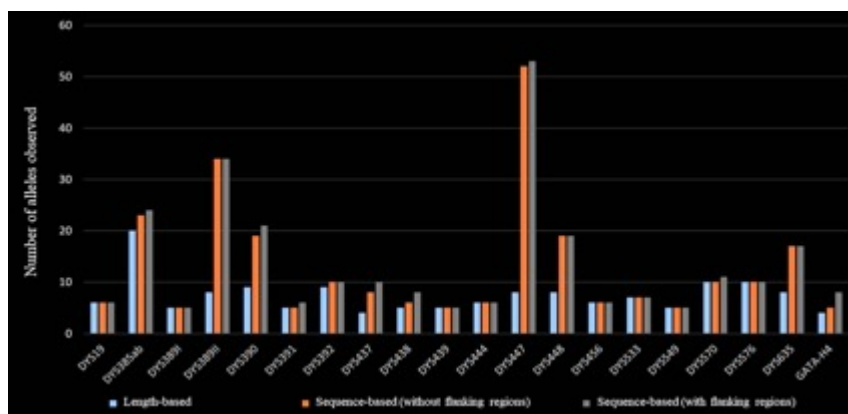


Figura 2A. (5) Diversidad alélica de A-STR en función del tipo de análisis (basado en longitud o secuencia, con o sin regiones flanqueantes). Este gráfico compara el número de alelos únicos observados en loci de A-STR en una muestra de 350 individuos mediante tres enfoques: basado en longitud (LB), basado en secuencia sin regiones flanqueantes (RSB), y basado en secuencia con regiones flanqueantes (FSB). La implementación de secuenciación masivamente paralela (MPS) reveló una mayor diversidad alélica en todos los loci, especialmente en D2S1338 y D2S11, con variaciones significativas entre técnicas. Este aumento en la resolución alélica, incluyendo regiones flanqueantes, mejora el poder discriminativo en genética forense, favoreciendo la identificación en mezclas de muestras y aumentando la capacidad de exclusión en perfiles genéticos.

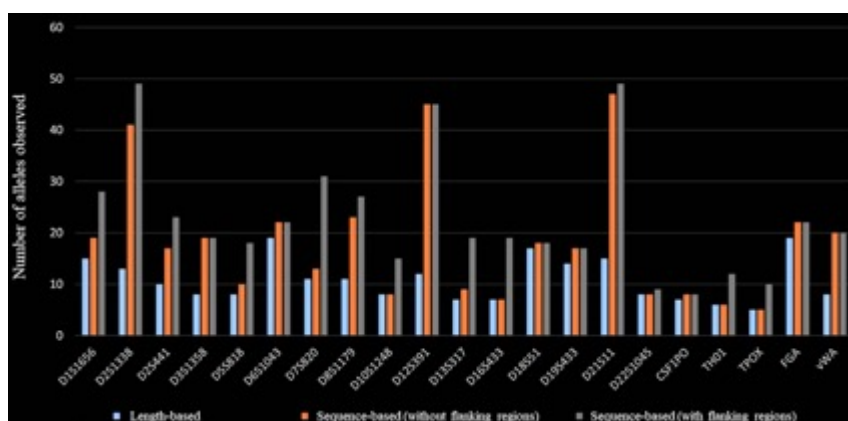


Figura 2B. (5) Diversidad alélica de loci Y-STR en función del tipo de análisis (basado en longitud o secuencia, con o sin regiones flanqueantes). En comparación con los A-STRs, los Y-STRs muestran un incremento alélico limitado, incluso al incluir análisis de secuencia y regiones flanqueantes. Loci como DYS447 y DYS385ab presentan alta diversidad, siendo DYS447 el más variable con 53 alelos únicos; sin embargo, esta variabilidad no alcanza la capacidad discriminativa de los A-STRs, que permiten una identificación individual más precisa.

Los métodos basados en longitud, como la electroforesis capilar, ofrecen una resolución limitada en Y-STRs al no detectar diferencias en secuencia. La secuenciación masivamente paralela (MPS) mejora el poder discriminativo al analizar tanto la longitud como la secuencia específica de los alelos, lo cual es clave para distinguir individuos masculinos relacionados.

Además, se identificaron 58 variaciones en las regiones flanqueantes de los STRs (6), lo que demuestra que la MPS aporta información adicional y es capaz de discriminar con mayor detalle, siendo relevante en la resolución de casos forenses complicados.

Aunque la MPS ha mejorado significativamente el análisis de ADN, su integración en las bases de datos forenses actuales sigue siendo un reto. A pesar de presentar una concordancia tan elevada, los resultados de MPS pueden no ser directamente comparables con los obtenidos mediante CE (7,8), lo que subraya la necesidad de un sistema de nomenclatura estandarizado que permita una mayor coherencia entre ambas.

5.2 Nuevos marcadores genéticos: microhaplotipos e InDel

Además de la NGS, los microhaplotipos y los InDel han cobrado relevancia como marcadores genéticos clave en biología forense. Los microhaplotipos son agrupaciones de SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido), pequeños cambios en una sola "letra" del ADN, como si fuesen "huellas dactilares" dentro del código genético. Con los microhaplotipos, en lugar de ver solo una marca (como los STR), se observa un grupo de marcas muy cercanas entre sí.

Ergo, proporcionan una mayor capacidad de discriminación que los STRs, pueden identificar a una persona con más precisión, especialmente en muestras degradadas o en casos donde hay muy poco ADN disponible.

Los InDel, representan inserciones o deleciones de nucleótidos en secuencias específicas del ADN (a diferencia de los SNPs, que solo cambian una base del ADN, los InDel implican la adición o eliminación de uno o más nucleótidos). Estos marcadores son estables y, al igual que los microhaplotipos, ofrecen información adicional crucial cuando los STRs no son suficientes para identificar a un individuo (5,9).

5.3 Análisis de ADN familiar

5.3.1 Marcadores de linaje: cromosoma Y, ADN mitocondrial y cromosoma X

Los marcadores de linaje, como el cromosoma Y, el ADN mitocondrial (mtDNA) y el cromosoma X, se utilizan para detectar asociaciones familiares en investigaciones forenses. El cromosoma Y se hereda exclusivamente a través de la línea paterna, lo que lo convierte en una herramienta esencial para identificar parentescos masculinos. El mtDNA, heredado únicamente por la línea materna, es útil en la identificación de restos humanos altamente degradados, como los encontrados en desastres naturales, debido a su resistencia.

El cromosoma X también es útil en la identificación familiar, aunque su patrón de herencia es más complejo, al ser heredado tanto por la madre como por el padre. Este marcador es particularmente útil cuando el ADN autosómico no proporciona suficiente información para confirmar relaciones biológicas (9).

El uso de polimorfismos del HLA como marcadores complementarios para pruebas de paternidad ha demostrado ser de gran relevancia en casos donde no son concluyentes los resultados del análisis de aSTR (Repeticiones Cortas en Tándem autosómicas) (10). El análisis de loci HLA, combinado con aSTR, ha incrementado los valores de razón de verosimilitud (LR) en casos complejos.

LR es una medida estadística utilizada en genética forense para evaluar la fuerza probatoria de una muestra de ADN. Compara dos hipótesis: la hipótesis de la fiscalía (H_p), donde el ADN pertenece al sospechoso, y la hipótesis de la defensa (H_d), donde el ADN proviene de otra persona. El cálculo se expresa como:

$$LR = P(\text{Evidencia } H_p) / P(\text{Evidencia } H_d)$$

Un LR mayor que 1 favorece la hipótesis de la fiscalía, sugiriendo que el ADN probablemente pertenece al sospechoso. Un LR menor que 1 apoya la hipótesis de la defensa, mientras que un LR igual a 1 indica que la evidencia no favorece ninguna de las dos.

Si se asocian los polimorfismos del HLA con las técnicas MPS, no solo mejora la capacidad de identificación, sino que también refuerza la fiabilidad del análisis forense en disputas de paternidad (Figura 3).

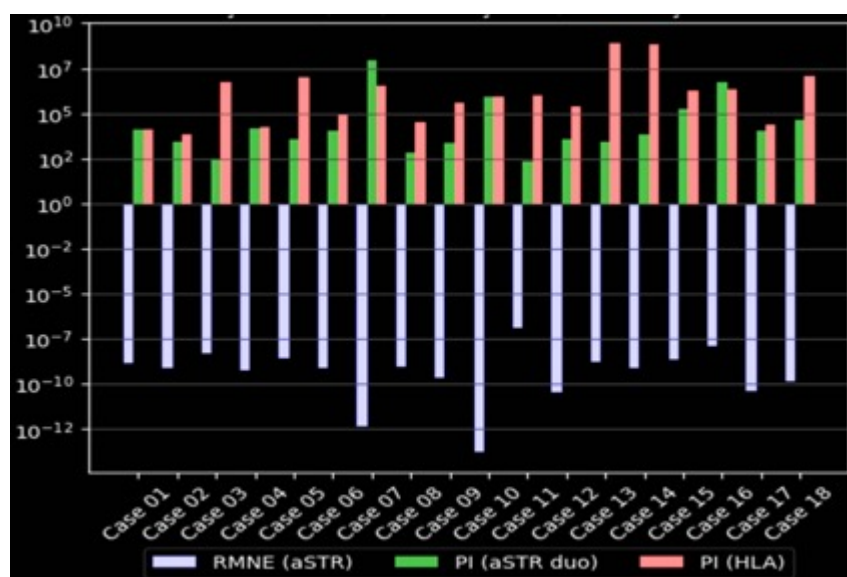


Figura 3. (10) Comparación de los índices de paternidad (PI) y valores de exclusión aleatoria (RMNE) en casos simulados de paternidad. En este estudio, un PI mayor a 10410^4104 se consideró suficiente para confirmar la relación padre-hijo. Las barras muestran los valores de Log10 del PI para dos tipos de análisis genético: loci aSTR (en verde) y genes HLA (en rojo). Los genes HLA tuvieron valores de PI mucho más altos que los aSTR, lo que indica una mayor capacidad para confirmar parentesco. El RMNE (Random Man Not Excluded, en azul) mide la probabilidad de que una persona no relacionada coincida con el perfil genético. Valores bajos de RMNE en todos los casos indican una baja probabilidad de coincidencia accidental, reforzando la hipótesis de paternidad en cada ejemplo. En conjunto, estos resultados muestran que los loci HLA ofrecen una mayor precisión que los aSTR en pruebas de parentesco.

Existen plataformas como CODIS (una base de datos nacional en los Estados Unidos que almacena perfiles de ADN de individuos condenados y arrestados) y GEDMatch (permite a los usuarios subir sus perfiles genéticos obtenidos de pruebas de ADN comercial), que permiten identificar relaciones familiares a partir de perfiles genéticos, facilitando la identificación incluso cuando no hay una muestra directa del sospechoso (11).

5.3.2 Fenotipificación del ADN: predicción de características físicas

La fenotipificación del ADN permite predecir características físicas, como el color de ojos, cabello y piel, a partir del ADN, facilitando la creación de una “descripción genética” en investigaciones donde no existe una identificación clara del sospechoso. Esta técnica permite elaborar un retrato robot basado en la genética del individuo (9).

Es esencial abordar consideraciones éticas y sociales en el uso de estas tecnologías. La recolección y almacenamiento de datos genéticos deben gestionarse con altos estándares de privacidad y consentimiento informado. Además, la capacidad de predecir rasgos físicos plantea preocupaciones sobre discriminación y sesgo racial, lo cual demanda un marco regulatorio robusto para asegurar un uso ético. Tecnologías avanzadas, como el análisis de HLA (10) y la MPS debe estar acompañada de mecanismos que eviten el uso indebido y protejan los derechos de las personas involucradas.

5.4 La ciencia forense y el desarrollo de nuevas metodologías en casos de agresión sexual

En el ámbito de las agresiones sexuales, la ciencia forense ha experimentado avances clave con la llegada de nuevas metodologías que permiten una mejor recolección y análisis de ADN, y con ello, una mayor precisión en la identificación de agresores. Y es que no es fácil enfrentarse a escenarios donde las muestras biológicas están mezcladas, degradadas o simplemente son mínimas. Aquí, las innovaciones recientes no solo han aumentado la fiabilidad de los resultados, sino que han facilitado la automatización del proceso forense, agilizando así las investigaciones y mejorando las tasas de éxito en la obtención de perfiles genéticos.

5.4.1 Extracción diferencial (DE): limitaciones y desafíos

La extracción diferencial (DE), famosa técnica introducida en los años 80, ha sido una técnica clave para separar el ADN de espermatozoides y células no espermáticas. Sin embargo, este método enfrenta limitaciones, como el “arrastre” de ADN no espermático hacia la fracción espermática, lo que contamina las muestras (12). Además, el proceso es laborioso y conlleva un riesgo significativo de pérdida de espermatozoides durante su manipulación. A pesar de los avances en automatización, como los sistemas Hamilton AutoLys y BioRobot EZ1 (13), la eficiencia perfecta en la recuperación del ADN espermático aún no se ha logrado, impulsando la búsqueda de métodos alternativos.

5.4.2 Innovaciones en la separación celular: SpermX y filtración manual (FM)

Entre las innovaciones recientes destaca SpermX, un sistema diseñado para mejorar la separación del ADN espermático en muestras mixtas. Utiliza membranas especializadas para capturar espermatozoides, permitiendo su automatización completa y procesando hasta 95 muestras de manera simultánea. SpermX es especialmente útil en situaciones donde el número de espermatozoides es muy bajo, como en agresiones donde ha pasado mucho tiempo desde el incidente. Por otra parte, la filtración manual (FM) (14), es un método más sencillo pero efectivo: utiliza filtros para atrapar los espermatozoides sin necesidad de recurrir a la centrifugación, evitando riesgos de pérdida celular ofreciendo una alternativa rápida y sencilla (Figura 4).



Figura 4. (14) Representación gráfica de un electroferograma inspirado en la imagen original publicada por [Nakagawa et al., 2022]. Electroferogramas de ADN espermático extraído de muestras mixtas mediante extracción diferencial (DE) y filtración por membrana (FM). Las imágenes (A) y (B) muestran perfiles obtenidos con DE, mientras que (C) y (D) corresponden a FM. Las flechas indican picos menores de ADN femenino, sugiriendo contaminación cruzada. Los números pequeños señalan los alelos en loci STR y los grandes, la intensidad de la señal. En muestras mixtas, el ADN espermático coexiste con ADN de células epiteliales femeninas, común en agresiones sexuales. Ambos métodos aíslan la fracción espermática, pero FM resulta más rápido y sencillo, con eficacia comparable, consolidándose como una opción prometedora en genética forense.

5.4.3 Captura de células espermáticas mediante dielectroforesis

DEPArray™ es un sistema de recuperación de células presentes en muy baja cantidad dentro de una muestra, que emplea dielectroforesis (DEP) para manipular y capturar espermatozoides individuales con alta sensibilidad y selectividad. La dielectroforesis utiliza un campo eléctrico no uniforme que genera un gradiente de fuerzas, permitiendo la captura precisa de células específicas. Una vez capturadas, el sistema DEPArray™ permite la identificación y el aislamiento de células espermáticas individuales mediante un enfoque basado en marcadores fluorescentes específicos. Inicialmente, se obtiene una imagen de campo claro, proporcionando una visualización morfológica general de la célula. Posteriormente, el canal APC (fluoróforo utilizado en técnicas de marcaje celular en citometría) detecta un marcador específico para espermatozoides, confirmando la identidad celular mediante fluorescencia. En paralelo, la señal del canal de ácidos nucleicos permite la detección del material genético presente en la célula. Finalmente, la superposición de ambos canales facilita la correlación entre la identidad espermática y la presencia de ADN, validando la captura de células espermáticas individuales con alta especificidad. Este enfoque optimiza el aislamiento celular en muestras forenses, asegurando la precisión en la selección y recuperación de espermatozoides a partir de matrices biológicas complejas.

Esta tecnología es particularmente útil en muestras forenses con escaso número de espermatozoides o en escenarios con múltiples contribuyentes masculinos, donde la extracción diferencial (DE) convencional no logra obtener un perfil STR de una sola fuente. Sin embargo, el DEPAarray™ presenta limitaciones: su uso implica mayor tiempo y una secuencia compleja de pasos operativos, incluyendo tinción y fijación, y es altamente costoso para aplicaciones rutinarias en laboratorios forenses

A pesar de estos desafíos, el DEPAarray™ representa una alternativa innovadora con potencial para su aplicación en casos de muestras mixtas complejas, ofreciendo precisión en la captura celular que podría superar las limitaciones de los métodos convencionales en genética forense (12).

5.4.4 Métodos alternativos a la extracción diferencial (DE) en genética forense

Si bien no existe aún una alternativa comercial que haya reemplazado de manera efectiva el método de extracción diferencial (DE) convencional, actualmente se encuentran en fase de investigación y desarrollo diversas tecnologías prometedoras. Un enfoque interesante es un método basado en el uso de un oligosacárido esencial en la unión espermatozoide-óvulo durante el proceso de fertilización. Este oligosacárido, anclado a la superficie de un chip microfluídico, permite la captura selectiva de células espermáticas al incubar en el chip una muestra que contiene tanto espermatozoides como células epiteliales. Durante la incubación, los espermatozoides se adhieren al oligosacárido, mientras que las células epiteliales son eliminadas mediante el flujo de lavado.

Este método ha sido probado con muestras simuladas de agresión sexual y ofrece la ventaja distintiva de realizar la lisis de las células espermáticas directamente en el chip, un paso que rara vez se integra en los métodos microfluídicos de DE. Sin embargo, la técnica enfrenta limitaciones, tales como el procesamiento de volúmenes de muestra pequeños (5-15 µL), un tiempo de incubación prolongado (60 minutos) y la falta de validación rigurosa en cuanto a la posible contaminación cruzada.

A pesar de estas limitaciones, este enfoque tiene el potencial de reemplazar el método DE convencional en el futuro. Con un mayor desarrollo, enfocado en mejorar la eficiencia, aumentar el rendimiento de ADN y minimizar los riesgos de contaminación, esta tecnología podría representar una alternativa viable para el procesamiento de muestras forenses de alto rendimiento y bajo costo (12).

5.4.5 Tecnología STR y Y-STR en ADN traza

En muchos casos de agresión sexual, no se produce eyaculación o la víctima se ha lavado tras el incidente. El análisis de ADN traza permite recolectar perfiles genéticos a partir de mínimas cantidades de ADN, como células epiteliales transferidas por contacto físico (15), siendo esencial en casos sin penetración o sin deposición de fluidos corporales. El uso de STR e Y-STR ha demostrado ser eficaz para identificar ADN masculino en estos escenarios complejos. Los Y-STR, que analizan marcadores en el cromosoma Y, permiten detectar perfiles masculinos aun cuando el ADN femenino está en mayor cantidad.

5.4.6 Avances en la automatización y purificación

La automatización en el análisis de ADN forense busca acelerar el procesamiento y reducir errores. La separación acústica utiliza ondas sonoras para purificar células sin productos químicos agresivos, logrando una separación eficiente en muestras mixtas y permitiendo análisis inmediatos en el lugar del crimen (16). Kits avanzados, como “MACSprep™ Forensic Sperm MicroBead Kit” y “Erase Sperm Isolation Kit” (17), han optimizado la recuperación y pureza del ADN espermático mediante microperlas magnéticas, reduciendo la contaminación cruzada.

5.4.7 Desempeño de las técnicas en escenarios forenses complejos

Tecnologías emergentes como SpermX y el método de filtración (FM) están revolucionando casos donde los métodos convencionales son insuficientes, optimizando la recuperación de ADN en escenarios complejos con muestras

mínimas o degradadas. Además, el ADN táctil, que permite la recolección por contacto sin necesidad de fluidos biológicos, ha expandido las posibilidades de identificación en agresiones sin deposición de fluidos.

Los avances en recolección y análisis de ADN en casos de agresión sexual están haciendo los procesos más rápidos y precisos, incluso en condiciones adversas. Tecnologías como la purificación acústica y la automatización han reducido tiempos de procesamiento y aumentado la precisión, permitiendo a los laboratorios abordar casos complejos con mayor eficacia.

A pesar de estos desarrollos, la extracción diferencial (DE) sigue siendo fundamental para separar células espermáticas de no espermáticas en muestras mixtas; sin embargo, su carácter manual limita la automatización y eficiencia. Alternativas como la dielectroforesis y la PCR de Y-STRs presentan enfoques novedosos, pero tienen limitaciones en individualización y aplicación forense.

Esta revisión examina tecnologías que ofrecen ventajas frente a la DE convencional. Métodos como DEPArray™ y ligandos específicos mejoran la recuperación en muestras con bajo contenido celular, mientras que el kit de aislamiento Erase minimiza pasos manuales. Aunque estos métodos sacrifican al menos un aspecto clave (rapidez, procesamiento, eficacia o automatización), su evolución futura podría satisfacer las demandas de eficiencia en genética forense para casos complejos.

Técnica	Ventajas	Limitaciones
SpermX	- Separación de ADN espermático en muestras mixtas - Útil en muestras antiguas o limitadas en cantidad - Permite automatización completa (procesa hasta 95 muestras)	- Requiere una calidad mínima para separar perfiles con éxito
Filtración Manual (FM)	- No es necesario centrifugar, evita riesgos de pérdida celular	- Baja reproducibilidad del procedimiento - Riesgo de contaminación cruzada - Procesamiento lento y laborioso
DEPArray	- Captura espermatozoides individuales con alta sensibilidad y selectividad - Útil en muestras escasas o mixtas complejas	- Procesamiento lento (tinción y fijación) - Alto coste para aplicaciones rutinarias
Chip microfluídico	- Lisis directa de espermatozoides en el chip, optimizando el proceso de análisis	- Volúmenes pequeños de muestra (5-15 µL) - Periodo de incubación prolongado - Posible contaminación cruzada
Tecnología STR y Y-STR en ADN Traza	- Detecta perfiles masculinos en casos sin eyaculación o tras lavado de la víctima - Útil en muestras con ADN femenino predominante	- Menor efectividad en casos con cantidades extremadamente bajas de ADN
Separación acústica	- Purifica células sin productos químicos agresivos - Útil en muestras mixtas - Permite análisis en el lugar del crimen	- Sensibilidad limitada en muestras degradadas o con baja cantidad de ADN - La presencia de fluidos mixtos, como semen en muestras vaginales o rectales, puede interferir en el proceso de separación debido a la interacción celular - Coste elevado y complejidad operativa

Kits avanzados	- Optimizan la recuperación de ADN espermático y reduce la contaminación cruzada - Incrementa la precisión de los resultados en muestras complejas	- Sacrifican al menos un aspecto clave (rapidez, procesamiento, eficacia o automatización)
-----------------------	---	--

Tabla 3. Resumen de metodologías emergentes en obtención y análisis de ADN en escenarios forenses de agresión sexual, comparando ventajas y limitaciones. Elaboración propia.

5.5 Dinámica del ADN en escenarios complejos: interpretación, transferencia y persistencia

5.5.1 Interpretación del ADN a nivel de fuente o sub-fuente (9)

La interpretación del ADN a nivel de fuente o sub-fuente es esencial en investigación forense. El análisis a nivel de fuente busca determinar si una muestra de ADN pertenece a un individuo específico, estableciendo una coincidencia directa con un sospechoso. En cambio, el análisis a nivel de sub-fuente permite identificar a los individuos involucrados en una mezcla de ADN, sin precisar el tipo de fluido o célula de origen, útil en casos con múltiples contribuyentes.

La diferencia clave es:

- Nivel de fuente: Identifica al donante y el tipo de fluido o célula (por ejemplo, sangre o saliva).
- Nivel de sub-fuente: Identifica al donante, pero no el origen biológico exacto.

El análisis de STRs mediante electroforesis capilar (CE) sigue siendo el método estándar en ambos niveles, aunque su interpretación puede verse afectada por artefactos, como el temido “stutter”.

5.5.2 Genotipado probabilístico y el desafío de Stutter

El genotipado probabilístico ha surgido como una herramienta avanzada para interpretar mezclas de ADN, proporcionando un análisis más preciso que los métodos tradicionales. Este enfoque calcula la probabilidad de que una mezcla de ADN contenga contribuciones de varios individuos, identificando la combinación de personas más probable que generó los alelos observados.

Un desafío significativo es el stutter, un artefacto generado durante la amplificación por PCR, que produce una repetición menos que el alelo verdadero, y que puede confundirse con un alelo real. Esto es especialmente problemático en muestras mixtas o de baja calidad, donde el stutter podría interpretarse erróneamente como ADN de otro individuo.

Software de genotipado probabilístico, como FaSTR DNA (18) permite ajustar cálculos para identificar y filtrar estos artefactos, mejorando la precisión y evitando errores en la interpretación de perfiles de ADN.

5.5.3 Interpretación del ADN a nivel de actividad (9)

La interpretación del ADN a nivel de actividad busca responder cómo, cuándo y por qué el ADN apareció en una escena del crimen, clave para evitar errores judiciales. Este enfoque, propuesto por la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG), plantea preguntas esenciales:

- ¿Cómo se depositó el ADN?: A través de contacto directo, transferencia secundaria o fluidos corporales.
- ¿Cuándo se depositó?: Durante el crimen o en otro momento.
- ¿Por qué está presente?: Es crucial evitar asociar la mera presencia de ADN con culpabilidad.

Por ejemplo, en un arma homicida, es fundamental determinar si el ADN se depositó durante el crimen o previamente. Los ratios de verosimilitud (LR) permiten evaluar hipótesis como estas, aunque la ISFG enfatiza que un LR elevado a nivel de sub-fuente no siempre es válido a nivel de actividad. Los factores contextuales son determinantes, y la extrapolación de LR debe justificarse adecuadamente.

5.5.4 El rol de los forenses y la falacia del fiscal

La falacia del fiscal ocurre cuando se asume erróneamente que la presencia de ADN implica culpabilidad. Los forenses deben evitar suposiciones sobre el modo de transferencia (directa o indirecta) sin evidencia concluyente. En

cambio, deben proporcionar evaluaciones objetivas basadas en ratios de verosimilitud, asesorando a fiscales y defensores para una interpretación imparcial que permita diferenciar entre culpabilidad y absolución.

5.5.5 Transferencia y Persistencia del ADN (9,19–22)

El ADN puede transferirse de manera primaria (contacto directo) o secundaria (a través de un intermediario), y su persistencia varía según las superficies y condiciones ambientales. En algunos casos, el ADN puede haberse depositado mucho antes del crimen, complicando su interpretación. Estudios recientes han mostrado que la última persona en manipular un objeto, como un arma o vehículo, no siempre es la mayor contribuyente de ADN, por lo que es esencial no sacar conclusiones apresuradas basadas únicamente en la presencia de ADN.

El análisis de ADN-TPPR (Transferencia, Persistencia, Prevalencia y Recuperación) ayuda a entender el comportamiento del ADN en distintos contextos. Herramientas como redes bayesianas y bases de datos como DNA-TrAC permiten interpretar el ADN con mayor precisión, proporcionando información estructurada para contextualizar las muestras y facilitar la evaluación pericial.

5.5.6 Factores ambientales y técnicas de análisis

La persistencia del ADN depende de factores como la temperatura, luz UV y humedad. Temperaturas superiores a 30°C aceleran su degradación, comprometiendo su utilidad en análisis forenses. Técnicas como PCR cuantitativa y electroforesis capilar (EC) han demostrado que interacciones activas, con mayor presión o movimiento, facilitan una mayor transferencia de ADN en comparación con interacciones pasivas. Estos factores deben considerarse para interpretar adecuadamente las pruebas, especialmente en escenas contaminadas.

5.6 Análisis de ADN en restos humanos degradados en contextos forenses

El análisis de ADN en restos humanos degradados —ya sea en huesos incinerados o sometidos a condiciones ambientales extremas— presenta uno de los mayores retos en la genética forense. Sin embargo, los avances tecnológicos han permitido que hoy se obtengan resultados que, hasta hace poco, parecían inalcanzables. Las técnicas actuales han evolucionado para extraer ADN, incluso cuando el material genético está comprometido en gran parte.

5.6.1 Evaluación de la degradación del ADN post mortem

Aunque estable en vida, el ADN comienza a degradarse rápidamente tras la muerte, y la genética forense utiliza esta degradación para estimar el intervalo post mortem (PMI). Métodos como la PCR en tiempo real (RT-qPCR) y la electroforesis en gel de células individuales (SCGE) han mostrado correlaciones prometedoras entre el grado de degradación del ADN y el PMI. Sin embargo, la variabilidad en los tejidos y las condiciones ambientales afecta significativamente los resultados (18).

5.6.2 Métodos de extracción de ADN: manuales vs automatizados

El estado de la muestra manda. Para restos extremadamente degradados, como huesos quemados, las técnicas manuales siguen siendo el estándar de oro. ¿Por qué? Porque la extracción orgánica, a través de fenol-cloroformo, maximiza la recuperación de ADN incluso en condiciones extremas. Este método es imprescindible cuando se necesita recuperar fragmentos cortos de ADN que de otro modo se perderían (23).

Por otro lado, los métodos automatizados como el EZ2 Connect agilizan el proceso, sobre todo cuando se trata de grandes volúmenes de muestras, como en desastres masivos. Sin embargo, si se trabaja con muestras altamente degradadas, las técnicas manuales aún son superiores. Automatización sí, pero en los contextos adecuados (23,24).

5.6.3 Selección de muestras óseas y técnicas especializadas

No todos los huesos son iguales. Los huesos densos, como la porción petrosa del hueso temporal, son entre 4 y 16 veces más eficaces para la recuperación de ADN en restos incinerados. Ofrecen protección frente a los daños térmicos y ambientales, lo que los convierte en una opción preferente para análisis forenses en condiciones extremas (4,25).

Los dientes también siguen siendo una excelente fuente de ADN, protegidos por el esmalte dental. Técnicas como la pulverización criogénica, que tritura los dientes a bajas temperaturas, exponen las zonas internas ricas en ADN, maximizando su recuperación (4,26).

5.6.4 Desmineralización y preparación de muestras óseas

La desmineralización del tejido óseo mediante EDTA es un paso esencial cuando se trabaja con huesos incinerados. ¿Por qué? Porque permite liberar el ADN atrapado en la matriz mineral sin dañarlo. La combinación de esta técnica con métodos basados en sílice ha demostrado ser altamente efectiva especialmente para muestras de huesos incinerados.

En casos de ADN extremadamente fragmentado, se recurre a descalcificaciones parciales para recuperar fragmentos cortos (inferiores a 185 bp), cruciales para amplificar los loci STR en análisis forenses (23).

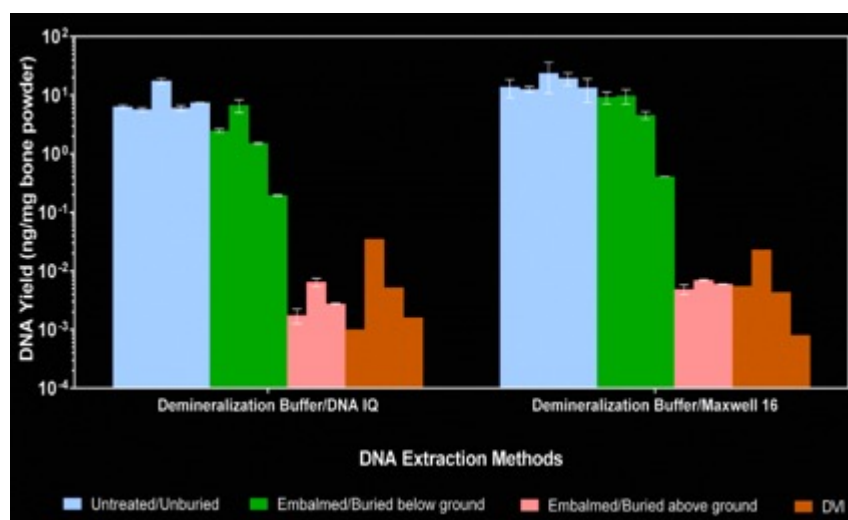


Figura 5. (27) Comparación del rendimiento de recuperación de ADN en muestras óseas utilizando un búfer de desmineralización con procedimientos manuales (DNA IQ) y automatizados en distintas condiciones de las muestras (no tratadas/no enterradas, embalsamadas/enterradas bajo tierra, embalsamadas/enterradas sobre el suelo y restos de víctimas de desastres, DVI).

El análisis revela que el rendimiento de ADN es significativamente mayor en muestras no tratadas y no enterradas (azul) en comparación con muestras embalsamadas y enterradas, especialmente en aquellas enterradas bajo tierra (rosa). Además, el flujo de trabajo automatizado con Maxwell mostró un incremento en la eficiencia de extracción de ADN en comparación con el método manual, evidenciando una mayor capacidad para minimizar la presencia de inhibidores y facilitar la obtención de perfiles genéticos en muestras degradadas o expuestas a condiciones adversas. Estos resultados subrayan la ventaja del método automatizado en contextos forenses con ADN comprometido, optimizando tanto la cantidad como la calidad del ADN recuperado para un análisis posterior.

5.6.5 Control de contaminación y manejo de Inhibidores

En cualquier laboratorio forense, controlar la contaminación es de vital importancia. La limpieza física de los huesos mediante lijado y la aplicación de hipoclorito de sodio (NaClO) para eliminar contaminantes deben realizarse con cautela. El NaClO, aunque efectivo, puede dañar el ADN endógeno si se utiliza en exceso (23,26). Además, técnicas como la pulverización criogénica no solo ayudan a exponer áreas ricas en ADN, sino que también minimizan el riesgo de degradación adicional durante la manipulación (4).

5.6.6 Análisis de ADN en escenarios de desastres masivos

En situaciones de desastres masivos, como incendios o ataques terroristas, el análisis forense enfrenta retos adicionales debido a la fragmentación y heterogeneidad de la mezcla de ADN. En estos casos, la selección de huesos densos y el uso de técnicas avanzadas como la pulverización dental y la desmineralización prolongada son clave para obtener perfiles genéticos que puedan ser analizados. El análisis de mtDNA —más resistente a la degradación que el ADN nuclear— se utiliza como una herramienta complementaria en la identificación de víctimas en estos escenarios (27).

5.6.7 Avances en la genómica de célula única

La genómica de célula única (scDNA) ha revolucionado el análisis genético forense al permitir la obtención de perfiles individuales incluso en mezclas de ADN. NGS ha mejorado la resolución y sensibilidad del análisis, siendo particularmente útil en escenas de crimen complejas donde múltiples sujetos están involucrados, aunque el ADN sea escaso o esté contaminado (28).

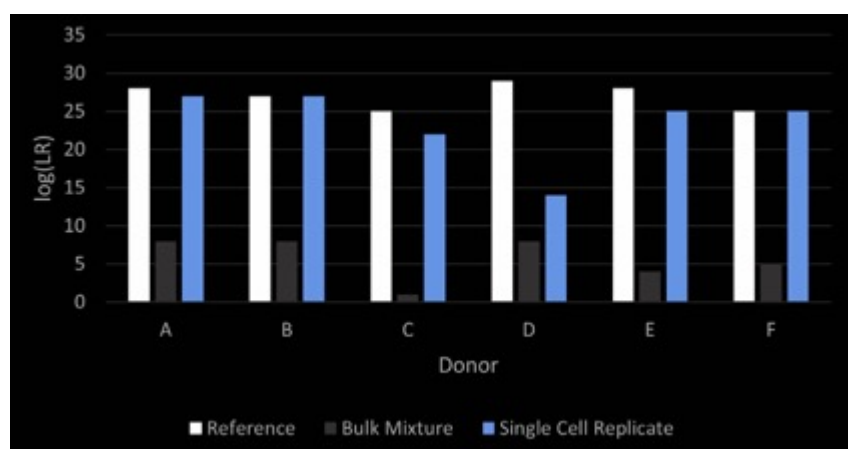


Figura 6. (28). La gráfica compara valores obtenidos en tres condiciones: muestra de referencia (barras blancas), mezcla en masa (barras negras) y replicados de células individuales (barras azules). El análisis de células individuales permite reconstituir perfiles genéticos en muestras de bajo nivel de ADN y mitiga efectos estocásticos como el drop-in (aparición de alelos externos) y drop-out (pérdida de alelos originales), comunes en análisis de ADN escaso. Este enfoque mejora la precisión y el poder de discriminación en la identificación de contribuyentes individuales en mezclas complejas, donde los métodos convencionales no logran diferenciarlos.

En definitiva, el análisis de ADN en restos humanos degradados plantea numerosos retos, pero la evolución constante de las técnicas forenses sigue ofreciendo soluciones efectivas. Los métodos manuales son insustituibles cuando el ADN está gravemente comprometido, mientras que la automatización es útil en contextos menos degradados. La combinación de técnicas como la desmineralización con EDTA, la pulverización criogénica y el uso de huesos densos maximiza la recuperación de ADN, facilitando el análisis forense incluso en escenarios extremos.

5.7 Nuevas fronteras: recuperación de ADN en superficies inusuales

5.7.1 Resultados de ADN en cartuchos disparados y no disparados (9)

Se contempla la escena: un casquillo de proyectil quemado, aún caliente, reposa en el suelo tras el reciente disparo. Tradicionalmente, se ha asumido que cualquier rastro de ADN se desvanece bajo el intenso calor generado por la explosión. El autor del disparo se retira, confiado en que no ha dejado evidencia genética alguna. Hasta hace poco, esta creencia habría sido correcta; los cartuchos disparados se consideraban pruebas genéticamente irrelevantes, condenadas al olvido en la investigación forense. Sin embargo, surge una pregunta fundamental: ¿y si esta premisa ya no es válida?

Uno de los avances más relevantes en la investigación forense reciente es la posibilidad de recuperar ADN de cartuchos disparados y no disparados mediante PCR directa. Anteriormente se asumía que el calor generado por el disparo de un arma destruía cualquier rastro de ADN, pero investigaciones recientes han demostrado que es posible recuperar ADN utilizable de casquillos disparados.

Este hallazgo tiene importantes implicaciones en investigaciones criminales, ya que permite identificar al tirador mediante el ADN recuperado de los cartuchos. El proceso es comparable a encontrar una huella digital en un objeto que se creía inservible por los efectos del calor, ofreciendo a los investigadores una nueva vía para obtener pruebas genéticas en casos sin otras evidencias.

5.7.2 Recuperación de ADN en condiciones de frío extremo

Se examina la eficacia de distintos métodos de recolección de ADN en muestras de sangre depositadas en nieve, un entorno particularmente desafiante para el análisis genético forense. Tiene como objetivo evaluar la capacidad de

recuperación de ADN empleando tres métodos: hisopos de algodón, papel FTA y papel de filtro sin tratar. Cada uno de estos métodos se prueba con el fin de determinar cuál proporciona una mayor cantidad de ADN y mejor calidad en la obtención de perfiles genéticos, además de reducir las exigencias de conservación posterior.

Para lograrlo, se utilizaron muestras de sangre humana colocadas en nieve recién caída. Los métodos se evaluaron mediante qPCR para cuantificar el ADN recuperado y electroforesis capilar para analizar la calidad del perfil genético. En este contexto, a pesar del análisis mediante métodos tradicionales, el uso de papel FTA y papel de filtro sin tratar representa una metodología moderna, ya que estos materiales son capaces de preservar la integridad del ADN en ambientes adversos, inactivando enzimas y contaminantes que pueden degradar la muestra. Los resultados indican que los tres métodos de recolección son efectivos, logrando recuperar suficiente ADN para el análisis y permitiendo la obtención de perfiles completos. No obstante, el papel de filtro sin tratar demostró una mayor cantidad promedio de ADN recuperado, mientras que el papel FTA mostró menores niveles de degradación.

Se concluye que los métodos de recolección evaluados son adecuados para la recuperación de ADN en climas fríos, aportando opciones viables para investigaciones forenses en entornos donde el ADN puede degradarse rápidamente. Además, se sugiere la necesidad de realizar estudios adicionales para analizar el impacto de la exposición prolongada y la composición de la nieve en la recuperación de ADN, lo que refuerza la utilidad de estos métodos en casos de crímenes en condiciones ambientales adversas (29).

5.8 Diferenciación genética avanzada en gemelos monocigóticos (MZ)

5.8.1 Identificación de gemelos monocigóticos en genética forense

Dos individuos, una sola huella genética. Los gemelos monocigóticos, idénticos en cada célula y en cada fragmento de ADN, han representado uno de los desafíos más complejos para la ciencia forense. Se plantea la escena: una muestra biológica en el lugar del crimen, limitada en cantidad, posiblemente contaminada, pero de relevancia crucial. Se enfrenta el dilema de identificar al responsable, uno de dos gemelos idénticos. ¿Cómo determinar la culpabilidad cuando el análisis de ADN tradicional no ofrece diferencias? Hasta hace poco, esta cuestión parecía insoluble. No obstante, surge una posibilidad: un detalle sutil, oculto en su código genético, una variación mínima que podría ser suficiente para distinguir a uno del otro.

Los gemelos monocigóticos, al ser genéticamente idénticos, plantean desafíos únicos para su diferenciación mediante tipificación estándar de STR. No obstante, los avances en NGS han demostrado que pueden presentar pequeñas variaciones genéticas. La identificación precisa en situaciones donde las muestras biológicas son limitadas o están contaminadas ha impulsado la combinación de estrategias como la secuenciación, el enriquecimiento de ADNmt mediante hibridación de sonda y técnicas de amplificación, lo que permite identificar diferencias genéticas sutiles que son clave en contextos forenses.

5.8.2 Metodologías de identificación

La combinación de secuenciación multitapa y enriquecimiento de ADNmt mediante sondas específicas permite detectar variaciones genéticas en niveles de heteroplasmia que aportan una diferenciación precisa en gemelos MZ. Una de las estrategias más prometedoras es la secuenciación multitapa, que ha revelado SNP asociados a niveles bajos de heteroplasmia, en los que las variantes están presentes en una pequeña fracción de las moléculas de ADN mitocondrial. Estas variaciones son útiles para diferenciar entre gemelos, lo que permite una discriminación clara a pesar de la similitud genética. Además, el enriquecimiento de ADNmt mediante sondas dirigidas ha aumentado la profundidad de la secuenciación, logrando identificar diferencias de heteroplasmia del 1.0%, 0.5%, y 0.1%. Este hecho sugiere que con un umbral de heteroplasmia menor del 1% los gemelos MZ se pueden diferenciar claramente. Además, el análisis de

correlación de Pearson reveló un aumento dependiente de la edad en el número de variantes heteroplásmicas, lo que refuerza su aplicabilidad en investigaciones forenses (30)

Se utilizaron muestras de sangre, hisopos bucales y saliva para llevar a cabo una secuenciación completa del genoma (WGS) con una cobertura superior a 78 veces permitiendo la identificación de variantes genéticas entre gemelos (31). Una alta profundidad de cobertura es crucial en investigaciones genómicas, ya que permite identificar variaciones genéticas con mayor certeza, minimizando el riesgo de errores en el mapeo de secuencias y garantizando que incluso las mutaciones menos frecuentes se detecten. Es especialmente importante en estudios forenses o genéticos, como en el análisis de gemelos monocigóticos, donde pequeñas diferencias genómicas pueden ser clave para la identificación.

5.8.3 Variaciones en el ADN nuclear

Los estudios han resaltado la importancia de las variaciones intrónicas en el ADN nuclear, que permiten identificar gemelos MZ a través de SNPs y variaciones en el número de copias (CNVs). Incluso cantidades pequeñas de ADN (~0.075 ng) han permitido confirmar variantes, lo que demuestra la utilidad potencial de los SNP como biomarcadores en muestras forenses (32).

Se examina la diferenciación de gemelos monocigóticos (MZ) mediante cambios de base única (SBCs), utilizando secuenciación del genoma completo (WGS) y secuenciación masiva en paralelo (MPS). Dado que los gemelos MZ comparten una secuencia genética casi idéntica, los SBCs postcigóticos que surgen en distintos tejidos se presentan como marcadores clave para su identificación forense.

Para el estudio, se analizaron muestras de sangre, saliva e hisopado bucal de gemelos MZ, identificando entre 1 y 9 SBCs específicos por par, los cuales permitieron diferenciarlos. Estos SBCs mostraron variabilidad entre tejidos, sugiriendo una variabilidad somática que podría influir en la selección del tipo de muestra en análisis forenses. Esto sugiere que un SBC presente en las células de un tejido podría no estar presente en otros, debido a mutaciones adquiridas después de la separación del cigoto.

Los resultados evidencian que los SBCs en ADN nuclear representan una herramienta efectiva para diferenciar gemelos idénticos en investigaciones criminales, superando las limitaciones de los análisis convencionales de STRs. Se argumenta que los SBCs, detectables mediante WGS y MPS, son biomarcadores viables para la identificación individual en gemelos MZ, y se propone la estandarización de este enfoque en el ámbito forense.

5.8.4 Heteroplasma del ADN mitocondrial

El ADNmt, debido a su alto número de copias y tasas más elevadas de sustitución de nucleótidos, es un objetivo clave para identificar gemelos MZ. La secuenciación de lectura larga y el uso de sondas dirigidas han permitido detectar pequeñas mutaciones y variaciones de heteroplasma, que pueden ser determinantes en la identificación cuando el ADN nuclear no es suficiente (33).

La heteroplasma representa un desafío significativo en la identificación forense, dado que ciertas variantes genéticas pueden manifestarse de manera diferencial entre tejidos, lo que puede comprometer la coherencia de los resultados obtenidos en los análisis de ADN. En este contexto, se ha observado que la detección de variantes somáticas específicas en tejidos seleccionados puede proporcionar herramientas diferenciadoras incluso en individuos con perfiles genéticos idénticos, como los gemelos MZ.

Un estudio previo (Yuan et al., 2020) describió la utilidad de esta estrategia en un caso forense donde la identificación del perpetrador entre gemelos idénticos se logró mediante secuenciación de nueva generación. Inspirado en este enfoque, se empleó la técnica ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System PCR) tras un análisis de WGS, con el objetivo de validar la presencia de una alteración genética en muestras obtenidas de sangre de dos gemelos. Los resultados indicaron que la variante analizada estaba exclusivamente presente en uno de ellos, mientras que no se

detectó en el otro, lo que sugiere la existencia de una mutación somática post-cigótica con potencial utilidad en el ámbito forense.

Además, se llevó a cabo un estudio comparativo en distintos tejidos, incluyendo saliva, semen, cabello y uñas, con el propósito de evaluar la distribución de la variante en ambos individuos. En uno de los gemelos, la alteración no se identificó en ninguna de las muestras analizadas, mientras que en el otro se detectó de manera específica en el ADN extraído de uñas, sin evidencias de su presencia en otras fuentes biológicas. Esta distribución heterogénea es consistente con la heteroplasmia y resalta la importancia de la selección del tipo de muestra en el análisis forense, especialmente en escenarios que requieren la diferenciación de individuos con genomas altamente similares.

5.8.5 Metilación del ADN

Se ha demostrado que la metilación de CpG diverge con la edad en gemelos MZ, proporcionando un biomarcador clave para su diferenciación. Los estudios han identificado 333 CpG metilados que muestran variaciones significativas entre gemelos MZ, sugiriendo un fuerte componente genético en la divergencia epigenética (34). Los evCpGs (CpG evolutivamente conservados) identificados se localizan predominantemente en la región de las protocadherinas en tejidos como la sangre y el tejido adiposo, lo cual sugiere que esta área del genoma presenta una elevada riqueza en variabilidad epigenética en gemelos monocigóticos. Esta concentración de evCpGs en la región de las protocadherinas podría indicar un papel significativo en los mecanismos de variación epigenética entre co-gemelos, lo que refuerza su potencial como área de estudio en la diferenciación epigenética forense.

5.8.6 Implicaciones para la investigación y la práctica forense (30,33,34)

La diferenciación entre gemelos MZ tiene importantes implicaciones en genética forense, y requiere un enfoque integral que combine ADN nuclear, ADN mitocondrial (ADNmt) y metilación del ADN. Este enfoque no solo mejora la precisión en la identificación individual, sino que también profundiza la comprensión de las interacciones genéticas y epigenéticas relevantes en el contexto forense, así como en estudios de enfermedades y envejecimiento. En investigaciones criminales, el uso de tecnologías avanzadas para analizar tanto el ADN nuclear como el ADNmt es esencial para resolver casos complejos donde las muestras son fragmentadas o limitadas en cantidad. La integración de estas metodologías aporta una solución robusta y confiable, ofreciendo un recurso poderoso para la práctica forense y la investigación genética.

5.9 Modelos forenses de predicción de la edad basados en la metilación del ADN

La predicción de la edad a partir de la metilación del ADN es una herramienta innovadora en ciencias forenses, facilitando la identificación en investigaciones criminales y legales (35). Esta técnica se basa en los cambios sistemáticos de metilación en posiciones de CpG del genoma, correlacionados con la edad, lo que permite desarrollar modelos predictivos con aplicaciones en la identificación de víctimas y resolución de crímenes (36).

5.9.1 Avances en tecnologías de detección

El avance en plataformas de medición, como EpiTYPER®, pyrosecuenciación y MiSeq, ha permitido una mayor precisión en la medición de la metilación (tabla 4). Aunque los sistemas como SNaPshot™ presentan mayor número de errores predictivos, la aplicación de técnicas de normalización, como la transformación Z-score, ha demostrado ser efectiva para mejorar la fiabilidad (37).

5.9.2 Aplicación de algoritmos de aprendizaje automático

No basta con detectar la metilación, hay que saber interpretarla. Aquí es donde los algoritmos de aprendizaje automático entran en escena. Herramientas como las máquinas de soporte vectorial (SVM) y los bosques aleatorios (RF) han transformado la predicción de la edad en una ciencia exacta. Estos modelos permiten predecir no solo la edad, sino también el origen de los tejidos en fluidos corporales, con tasas de éxito cercanas al 100% (38). Estos avances en modelos

predictivos han ampliado el uso de la metilación del ADN en casos forenses, mejorando la precisión en la identificación de diferentes fluidos corporales en escenas del crimen.

	Extensión de una base (SBE)	Pyrosecuenciación	MassARRAY® de EpiTYPER®	Secuenciación masiva paralela (MPS)
Plataforma de detección	Electroforesis capilar	PyroMark	MALDI-TOF espectrometría de masas	Plataforma MPS
Longitud de la región analizada (bp)	1	<100	100-600	<300
Capacidad de multiplexación	Limitada (un CpG por cebador SBE)	Baja (un amplicón por análisis)	Moderada (una región objetivo por análisis)	Alta (múltiples regiones objetivo)
Estado de metilación detectado	Un CpG por cebador SBE	Todos los CpGs en la región objetivo		
Ventajas en análisis forense	Identificar metilaciones en posiciones individuales (SNPs); bien adaptada a kits forenses	Alta precisión en la cuantificación de la metilación; útil para CpGs específicos	Capaz de analizar múltiples CpGs en una sola región; alta sensibilidad para predicción de edad	Permite el análisis de grandes cantidades de CpGs simultáneamente; alta resolución para muestras complejas
Limitaciones en análisis forense	Cada CpG requiere un cebador específico, lo que limita su capacidad de multiplexación; no es adecuada para múltiples CpGs	Baja capacidad de multiplexación requiere múltiples reacciones para analizar varias regiones; necesita ADN de buena calidad	Limitada a una región CpG por reacción, depende de equipamiento específico (MALDI-TOF); alta cantidad de ADN requerido	Costo elevado y requiere infraestructura avanzada; el tiempo de análisis y los recursos pueden ser contraproducentes en contextos de urgencia forense
Ejemplos en aplicaciones forenses	Detección de metilación en SNPs específicos para identificación de individuos en estudios de poblaciones con poca variabilidad.	Predicción de edad a partir de CpGs específicos; análisis de muestras degradadas con limitaciones de multiplexación.	Estimación de edad en estudios forenses de casos sin suficientes evidencias nucleares; estudios de diferenciación entre gemelos idénticos.	Perfilado completo de patrones de metilación en muestras complejas; identificación en contextos donde se requiere alta resolución y capacidad de múltiples CpGs.

Tabla 4. Comparación de tecnologías para el análisis de metilación de ADN en genética forense basada en Refn et al., 2023 (35) organizada en un cuadro de elaboración propia.

5.9.3 Estudios longitudinales y variabilidad interindividual

Los estudios longitudinales han permitido mapear miles de posiciones CpG en el genoma que se correlacionan con la edad (figura 7). Plataformas como el Illumina EPIC850k han demostrado que estos cambios en la metilación (36)

pueden ser rastreados a lo largo de la vida de un individuo, mostrando una variación del 10-15%. Sin embargo, aquí surge uno de los grandes desafíos: la variabilidad entre individuos. Lo que funciona de manera general, puede no aplicarse a casos específicos. Este hecho plantea la necesidad de ajustar los modelos forenses para asegurar que se adapten a las particularidades de cada caso.

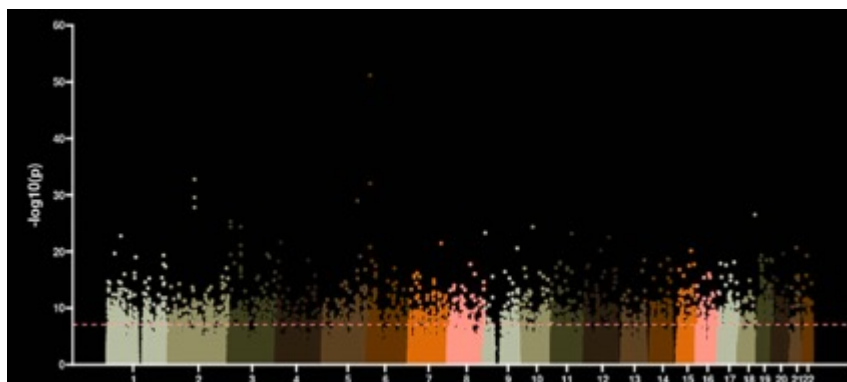


Figura 7. (36) Resultados del estudio EWAS longitudinal sobre la edad. La ilustración Manhattan plot representa la asociación entre los niveles de metilación del ADN y la edad cronológica en diversas posiciones CpG distribuidas a lo largo de los 22 cromosomas. Cada punto en el gráfico corresponde a un sitio CpG, y el eje vertical ($-\log_{10}(p)$) indica el nivel de significancia estadística de dicha asociación. Los puntos situados por encima de la línea roja discontinua representan sitios CpG donde la relación entre la metilación y la edad alcanza significancia estadística tras la corrección de Bonferroni ($p < 0.05$).

En total, se identificaron 2821 posiciones CpG con una asociación significativa con la edad. De estas, algunas posiciones mostraron una disminución en los niveles de metilación (hipometilación) y otras un aumento (hipermetilación) conforme avanza la edad. Estos cambios epigenéticos asociados a la edad pueden ser útiles como biomarcadores en el contexto forense para estimar la edad cronológica de un individuo a partir de una muestra de ADN, incluso en escenarios donde el ADN nuclear esté comprometido o sea limitado.

5.9.4 Desafíos y nuevas innovaciones

Uno de los principales desafíos en la predicción de la edad forense es la necesidad de ADN de alta calidad, algo que rara vez se encuentra en escenas del crimen (35). Sin embargo, los recientes avances en métodos de metilación que no requieren conversión de bisulfito —técnica esencial en el análisis de la metilación del ADN, utilizada para identificar qué citosinas están metiladas y cuáles no. Este proceso transforma las citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios— están ofreciendo nuevas posibilidades para superar estas limitaciones y mejorar la eficiencia de los modelos.

La predicción de la edad a partir de la metilación del ADN está aún consolidándose como técnica en el ámbito forense. A medida que la tecnología continúa evolucionando, la precisión y aplicabilidad de estos modelos seguirán mejorando, expandiendo su uso en una amplia variedad de contextos forenses y legales.

5.10 Microbioma Forense y Necrobioma

5.10.1 Estimación del intervalo post mortem (PMI)

El final de la vida marca el comienzo de un proceso silencioso, pero implacable. En el interior del cuerpo, los microorganismos que alguna vez coexistieron en equilibrio, comienzan a transformarse. Lo que a simple vista parece inmóvil, en realidad está lleno de actividad microbiana. Este mundo oculto ha despertado un interés creciente en la ciencia forense, revelando que la composición del microbioma humano no solo es un reflejo de nuestra vida, sino también una herramienta para desvelar el tiempo transcurrido desde la muerte.

El microbioma humano consiste en una inmensa diversidad de microorganismos (bacterias, virus, hongos y protistas) distribuidos por todo el cuerpo, cuya composición varía según factores como la genética, el estilo de vida y el entorno. Además de su rol en la salud, el microbioma es relevante en las investigaciones forenses, especialmente para la identificación de la causa de muerte y la estimación del intervalo post mortem (PMI) (39,40)

El necrobioma se refiere a las comunidades microbianas que interactúan con los restos en descomposición. Durante este proceso, ciertas familias bacterianas, como Bacillota y Pseudomonadota, cambian constantemente de manera predecible, lo que permite correlacionar su presencia con el tiempo transcurrido desde la muerte, ofreciendo un marcador confiable del PMI que complementa los métodos tradicionales basados en la morfología del cuerpo.

Los estudios sobre el microbioma forense utilizan secuenciación de ADN (como la región V4 del gen 16S rRNA con NGS) para analizar la persistencia del microbioma en cadáveres a lo largo del tiempo (41,42), comparando la firma microbiana en distintas etapas de descomposición. Esto proporciona información valiosa sobre cómo varía la composición microbiana y su utilidad para la estimación precisa del PMI en cadáveres almacenados bajo diversas condiciones.

5.10.2 Determinar la ubicación geográfica o ambiental

El microbioma no solo habla del cuerpo, también del entorno que lo rodea. Cada lugar en el mundo, desde un bosque hasta una ciudad, tiene su propio "sello" microbiano. Comparar las bacterias halladas en un cadáver con las del entorno puede revelar si el cuerpo ha sido movido. ¿Está el cadáver donde murió o fue transportado? Si el microbioma no coincide con el ambiente actual, eso podría indicar que el cuerpo estuvo en otra localización antes de ser abandonado.

El análisis de las comunidades microbianas permite no solo saber el tiempo transcurrido desde la muerte, sino también rastrear el camino que ha seguido el cadáver, o identificar si estuvo sumergido en agua o en contacto con suelos específicos. Este rastro invisible puede ser la clave en una investigación.

5.10.3 Diferenciación entre individuos

Aunque todos compartimos microorganismos, cada persona tiene un microbioma único, como una huella dactilar biológica. Esto significa que el rastro microbiano que dejamos en una prenda, un arma o una escena del crimen puede vincularnos directamente. Al analizar estas "huellas" bacterianas, los forenses pueden determinar quién ha estado en contacto con un objeto o lugar.

Más aún, el microbioma no solo revela quién ha estado presente, sino también cómo. El tipo de bacterias varía según la parte del cuerpo: la piel, la boca o el intestino. Esto permite identificar si alguien tocó un objeto o si hubo contacto más íntimo. En casos donde el ADN humano es escaso o degradado, el microbioma puede convertirse en la pieza clave que desvele la verdad.

6. CONCLUSIÓN

Esta revisión ha permitido examinar los avances en el análisis de ADN forense, destacando las metodologías de identificación y perfilado genético que mejoran significativamente los resultados en condiciones adversas. Tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS), el uso de microhaplotipos y la incorporación de marcadores epigenéticos han demostrado una eficacia notable en contextos donde las muestras están degradadas o contaminadas, superando las limitaciones de los métodos tradicionales, que en muchas ocasiones no logran resultados óptimos en escenarios complejos.

Al contrastar estas técnicas modernas frente a las convencionales, se evidencian ventajas claras, aunque su implementación enfrenta desafíos en términos de costos y requerimientos de infraestructura. Aun así, el estudio demuestra que estas nuevas tecnologías permiten una mayor capacidad de análisis de ADN en escenarios complejos, como en restos humanos degradados y casos de agresión sexual, proporcionando perfiles genéticos precisos y detallados.

A partir de la revisión de estas metodologías, se identifican áreas de mejora, como la optimización en el manejo de datos y la integración de estos métodos en protocolos estandarizados que aumenten la eficacia en las investigaciones judiciales. La implementación de técnicas de predicción de edad basada en la epigenética y la diferenciación avanzada en contextos como la identificación de gemelos monocigóticos destacan como posibles áreas de desarrollo y perfeccionamiento, lo que sugiere un campo en constante evolución.

En términos de aplicaciones prácticas, estas innovaciones han demostrado un impacto significativo en la resolución de casos forenses complejos, donde las pruebas convencionales serían insuficientes. La dinámica del ADN en escenarios de transferencia y persistencia, junto con su recuperación en objetos específicos como cartuchos disparados, refuerzan el valor de estas técnicas en la reconstrucción de escenas de crimen. En conjunto, este trabajo subraya la contribución fundamental de las metodologías modernas en la ciencia forense y plantea perspectivas de desarrollo continuo, asegurando que las investigaciones criminales puedan beneficiarse de los avances más recientes en genética forense en cualquier contexto judicial.

La principal barrera para la implementación de estas metodologías en laboratorios forenses no radica en su eficacia, sino en la falta de inversión en tecnología y recursos especializados. A pesar de su potencial para mejorar la identificación en escenarios complejos, el alto costo de los equipos, reactivos y la formación de personal limita su adopción. Esta situación refleja una problemática más amplia: la insuficiente asignación de fondos para el desarrollo y aplicación de herramientas avanzadas en ciencias forenses, lo que perpetúa la dependencia de métodos tradicionales menos eficientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bazyar H. On the Application of Microfluidic-Based Technologies in Forensics: A Review. *Sensors* (Basel, Switzerland). 24 de junio de 2023;23(13):5856.
2. Dash HR. Advancements in differentiation between sperm cells and epithelial cells for efficient forensic DNA analysis in sexual assault cases. *Int J Legal Med* [Internet]. 12 de julio de 2024 [citado 4 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03285-1>
3. McDonald C, Taylor D, Linacre A. PCR in Forensic Science: A Critical Review. *Genes*. 29 de marzo de 2024;15(4):438.
4. Mckinnon M, Henneberg M, Higgins D. A review of the current understanding of burned bone as a source of DNA for human identification. *Science & Justice*. 1 de julio de 2021;61(4):332-8.
5. Li H, Li B, Liu Y, Yang F, Cao Y, Xie J, et al. Characterization of sequence variations in the extended flanking regions using massively parallel sequencing in 21 A-STRs and 21 Y-STRs. *BMC Genomics*. 7 de septiembre de 2024;25:841.
6. Hölzl-Müller P, Bodner M, Berger B, Parson W. Exploring STR sequencing for forensic DNA intelligence databasing using the Austrian National DNA Database as an example. *Int J Legal Med*. 2021;135(6):2235-46.
7. Puch-Solis R, Pope S. Interpretation of DNA data within the context of UK forensic science — evaluation. *Emerg Top Life Sci*. 24 de septiembre de 2021;5(3):405-13.
8. Pope S, Puch-Solis R. Interpretation of DNA data within the context of UK forensic science — investigation. *Emerg Top Life Sci*. 24 de septiembre de 2021;5(3):395-404.
9. Butler JM. Recent advances in forensic biology and forensic DNA typing: INTERPOL review 2019–2022. *Forensic Sci Int Synerg*. 27 de diciembre de 2022;6:100311.
10. Kouniaki DI, Fotopoulos KV, Tarassi K, Tsirogianni A. Utilizing Massively Parallel Sequencing (MPS) of Human Leukocyte Antigen (HLA) Gene Polymorphism to Assess Relatedness in Deficiency Parentage Testing. *Genes* (Basel). 24 de enero de 2024;15(2):150.
11. Mateen RM, Sabar MF, Hussain S, Parveen R, Hussain M. Familial DNA analysis and criminal investigation: Usage, downsides and privacy concerns. *Forensic Science International*. 1 de enero de 2021;318:110576.
12. Clark C, Turiello R, Cotton R, Landers JP. Analytical approaches to differential extraction for sexual assault evidence. *Analytica Chimica Acta*. 2 de enero de 2021;1141:230-45.
13. Sinha SK, Brown H, Holt H, Khan M ro, Brown R, Sgueglia JB, et al. Development and validation of a novel method “SpermX™” for high throughput differential extraction processing of sexual assault kits (SAKs) for DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*. 1 de julio de 2022;59:102690.
14. Nakagawa T, Doi M, Nishi K, Sugahara T. Advantages of filtration method for sperm-DNA genotyping in sexual assault cases. *Legal Medicine*. 1 de febrero de 2022;54:101988.

15. Valentine JL, Presler-Jur P, Mills H, Miles S. Evidence Collection and Analysis for Touch Deoxyribonucleic Acid in Groping and Sexual Assault Cases. *J Forensic Nurs.* 2021;17(2):67-75.
16. Sun K, Wang H, Wang L, Lu Y, Liu R, Liu P, et al. A portable sperm cell purification instrument based on continuous flow acoustophoretic separation of sperm cells for on-site forensic sample pretreatment. *Lab Chip.* 9 de marzo de 2021;21(5):933-41.
17. Grosjean F, Favre M, Castella V. Comparison between MACSprep™ forensic sperm microbead kit and Erase Sperm Isolation kit for the enrichment of sperm fractions recovered from sexual assault samples. *Int J Legal Med.* 2023;137(1):267-78.
18. Tozzo P, Scrivano S, Sanavio M, Caenazzo L. The Role of DNA Degradation in the Estimation of Post-Mortem Interval: A Systematic Review of the Current Literature. *International Journal of Molecular Sciences.* 17 de mayo de 2020;21(10):3540.
19. Reither JB, van Oorschot RAH, Szkuta B. DNA transfer between worn clothing and flooring surfaces with known histories of use. *Forensic Science International: Genetics.* 1 de noviembre de 2022;61:102765.
20. Reither JB, Gray E, Durdle A, Conlan XA, van Oorschot RAH, Szkuta B. Investigation into the prevalence of background DNA on flooring within houses and its transfer to a contacting surface. *Forensic Science International.* 1 de enero de 2021;318:110563.
21. Żarczyńska M, Żarczyński P, Tomsia M. Nucleic Acids Persistence—Benefits and Limitations in Forensic Genetics. *Genes.* 18 de agosto de 2023;14(8):1643.
22. Fantinato C, Fonnéløp AE, Bleka Ø, Vigeland MD, Gill P. The invisible witness: air and dust as DNA evidence of human occupancy in indoor premises. *Scientific Reports.* 4 de noviembre de 2023;13:19059.
23. Malik SD, Pillai JP, Malik U. Forensic genetics: Scope and application from forensic odontology perspective. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2022;26(4):558-63.
24. Doniec A, Januła M, Sekuła A, Kowalczyk M, Ba G, Kupiec T. Validation process of automatic DNA extraction from bone material using a new advanced protocol for the EZ2 Connect instrument. *Forensic Science International: Genetics.* 1 de julio de 2024;71:103054.
25. Stan E, Muresan CO, Dumache R, Ciocan V, Ungureanu S, Mihailescu A, et al. From Jane Doe to Sofia: DNA Extraction Protocol from Bones and Teeth without Liquid Nitrogen for Identifying Skeletal Remains. *Int J Mol Sci.* 8 de mayo de 2024;25(10):5114.
26. Tozzo P, Mazzobel E, Marcante B, Delicati A, Caenazzo L. Touch DNA Sampling Methods: Efficacy Evaluation and Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 8 de diciembre de 2022;23(24):15541.
27. Calacal GC, Gallardo BG, Apaga DLT, De Ungria MCA. Improved autosomal STR typing of degraded femur samples extracted using a custom demineralization buffer and DNA IQ™. *Forensic Sci Int Synerg.* 8 de enero de 2021;3:100131.
28. Huffman K, Ballantyne J. Single cell genomics applications in forensic science: Current state and future directions. *iScience.* 23 de septiembre de 2023;26(11):107961.
29. Biggin MRK, Albrecht I, Novroski NMM. Assessing DNA recovery and profile determination from bloody snow. *Science & Justice.* 1 de marzo de 2022;62(2):152-5.
30. Zhong Y, Zeng K, Adnan A, Li YZ, Hou X kai, Pan Y, et al. Discrimination of monozygotic twins using mtDNA heteroplasmy through probe capture enrichment and massively parallel sequencing. *Int J Legal Med.* 1 de septiembre de 2023;137(5):1337-45.
31. Hwa HL, Lin CY, Yu YJ, Linacre A, Lee JCI. DNA identification of monozygotic twins. *Forensic Science International: Genetics.* 1 de marzo de 2024;69:102998.
32. Sun W, Wang Z, Wen S, Huang A, Li H, Jiang L, et al. Technical strategy for monozygotic twin discrimination by single-nucleotide variants. *Int J Legal Med.* 1 de mayo de 2024;138(3):767-79.
33. Yuan L, Chen X, Liu Z, Liu Q, Song A, Bao G, et al. Identification of the perpetrator among identical twins using next-generation sequencing technology: A case report. *Forensic Science International: Genetics.* 1 de enero de 2020;44:102167.
34. Jiménez BP, Liu F, Caliebe A, González DM, Bell JT, Kayser M, et al. Equivalent DNA methylation variation between monozygotic co-twins and unrelated individuals reveals universal epigenetic inter-individual dissimilarity. *Genome Biology.* 5 de enero de 2021;22:18.
35. Refn MR, Kampmann ML, Morling N, Tfelt-Hansen J, Børsting C, Pereira V. Prediction of chronological age and its applications in forensic casework: methods, current practices, and future perspectives. *Forensic Sciences Research.* 30 de junio de 2023;8(2):85.

36. Refn MR, Andersen MM, Kampmann ML, Tfelt-Hansen J, Sørensen E, Larsen MH, et al. Longitudinal changes and variation in human DNA methylation analysed with the Illumina MethylationEPIC BeadChip assay and their implications on forensic age prediction. *Scientific Reports*. 8 de diciembre de 2023;13:21658.
37. Freire-Aradas A, Pośpiech E, Aliferi A, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Pisarek A, et al. A Comparison of Forensic Age Prediction Models Using Data From Four DNA Methylation Technologies. *Frontiers in Genetics*. 19 de agosto de 2020;11:932.
38. Fang Y, Chen M, Zhu B. Construction and evaluation of in-house methylation-sensitive SNaPshot system and three classification prediction models for identifying the tissue origin of body fluid. *Journal of Zhejiang University Science B*. 27 de junio de 2023;24(9):839.
39. Cláudia-Ferreira A, Barbosa DJ, Saegeman V, Fernández-Rodríguez A, Dinis-Oliveira RJ, Freitas AR, et al. The Future Is Now: Unraveling the Expanding Potential of Human (Necro)Microbiome in Forensic Investigations. *Microorganisms*. 7 de octubre de 2023;11(10):2509.
40. Sessa F, Salerno M. Special Issue “Molecular Biology in Forensic Science: Past, Present and Future”. *International Journal of Molecular Sciences*. 1 de marzo de 2024;25(5):2883.
41. Sguazzi G, Mickleburgh HL, Ghignone S, Voyron S, Renò F, Migliario M, et al. Microbial DNA in human nucleic acid extracts: Recoverability of the microbiome in DNA extracts stored frozen long-term and its potential and ethical implications for forensic investigation. *Forensic Science International: Genetics* [Internet]. 1 de julio de 2022 [citado 16 de octubre de 2024];59. Disponible en: [https://www.fsigenetics.com/article/S1872-4973\(22\)00027-8/fulltext](https://www.fsigenetics.com/article/S1872-4973(22)00027-8/fulltext)
42. Sijen T, Harbison S. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. *Genes*. 28 de octubre de 2021;12(11):1728.

ANEXO 1: Índice de abreviaturas

A-STR – Autosomal Short Tandem Repeat (Repeticiones Cortas en Tándem Autosómicas)

ADN – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

ADN-TPPR – Transfer, Persistence, Prevalence, and Recovery of DNA (Transferencia, Persistencia, Prevalencia y Recuperación de ADN)

ALS – Alternative Light Source (Fuente de Luz Alternativa)

APC – Allophycocyanin (Aloficocianina)

ARMS-PCR – Amplification Refractory Mutation System PCR (Sistema de Mutación Refractaria por PCR)

BP – Base Pair (Par de Bases)

CE – Capillary Electrophoresis (Electroforesis Capilar)

CODIS – Combined DNA Index System (Sistema Combinado de Índices de ADN)

CNVs – Copy Number Variations (Variaciones en el Número de Copias)

CpG – Citosina-Fosfato-Guanina (Regiones Ricas en CpG, Asociadas a la Metilación del ADN)

DE – Differential Extraction (Extracción Diferencial)

DEP – Dielectrophoresis (dielectroforesis)

DNA IQ – ADN Inteligencia Cuantificable (Sistema de Purificación de ADN)

DNA-TRAC – DNA Traceability Analysis (Análisis de Trazabilidad del ADN)

DVI – Disaster Victim Identification (Identificación de víctimas en desastres)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido Etilenodiaminotetraacético, usado como anticoagulante en muestras biológicas)

evCpGs – evolutionary CpGs (CpGs evolutivos)

FAST DNA – Fast DNA Extraction (Extracción Rápida de ADN)

FM – Manual filtration (Filtración manual)

FSB – Flanking Sequence-Based (Basado en Secuencias Flanqueantes)

Hd – Defense Hypothesis (Hipótesis de la defensa)

HLA – Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitario Humano)

Hp – Prosecution Hypothesis (Hipótesis del fiscal)

Indel – Insertion/Deletion (Inserción/Delección, tipo de variación genética)

ISFG – International Society for Forensic Genetics (Sociedad Internacional de Genética Forense)

LR – Likelihood Ratio (Razón de Verosimilitud, utilizada en análisis probabilístico forense)

ME – Manual extraction (Extracción manual)

MisEq – MiSeq Sequencing System (Sistema de Secuenciación MiSeq, basado en tecnología de Illumina)

MPS – Massively Parallel Sequencing (Secuenciación Masivamente Paralela)

mRNA – Messenger RNA (ARN Mensajero)

mTDNA – Mitochondrial DNA (ADN Mitocondrial)

MZ – Monozygotic (Gemelos Monocigóticos)

NGS – Next-Generation Sequencing (Secuenciación de Nueva Generación)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PI – Pattern Index (Índice de paternidad)

PMI – Post-Mortem Interval (Intervalo Post-Mortem)

PRMA – Probabilistic RNA Matching Algorithm (Algoritmo Probabilístico de Emparejamiento de ARN)

PRM1 – Protamine 1 (Protamina 1)

PSA – Prostate-Specific Antigen (Antígeno Prostático Específico)

RF – Random Forest (Bosques Aleatorios, modelo de aprendizaje automático)

rRNA – Ribosomal RNA (ARN Ribosómico)

RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa)

RT-qPCR – Real-Time Quantitative PCR (PCR Cuantitativa en Tiempo Real)

SAP – Seminal Acid Phosphatase (Fosfatasa Ácida Seminal)

SBCs – Single Base Changes (Cambios de Base Únicos)

SCGE – Single-Cell Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Célula Única, también conocida como Ensayo Cometa)

SEM – Semen

SEM-EDX – Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (Microscopía Electrónica de Barrido con Espectroscopía de Rayos X Dispersiva por Energía)

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleótido Único)

SPE – Solid-Phase Extraction (Extracción en Fase Sólida)

STR – Short Tandem Repeat (Repeticiones Cortas en Tándem)

SVM – Support Vector Machine (Máquina de Vectores de Soporte, modelo de aprendizaje automático)

UV – Ultraviolet (Ultravioleta)

UV-VIS – Ultraviolet-Visible Spectroscopy (Espectroscopia Ultravioleta-Visible)

VAP – Vaginal Acid Phosphatase (Fosfatasa Ácida Vaginal)

VNTRS – Variable Number Tandem Repeats (Repeticiones en tándem de número variable)

WGS – Whole Genome Sequencing (Secuenciación del Genoma Completo)

Y-STR – Y-Chromosomal Short Tandem Repeat (Repeticiones Cortas en Tándem del Cromosoma Y)