

¿La edad es solo un número?

Determinación de la edad de un individuo con fines forenses

Amanda Abad Romero

Trabajo de Fin de Máster en Genética, Química y Física Forense

Supervisora externa: Dra. Ana M^a Freire Aradas
(Instituto de Ciencias Forenses Luis Cocheiro, INCIFOR)

Supervisor académico: Dr. Santiago García Vallvé
(Universidad Rovira i Virgili, URV)



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 2020

Contenidos

Introducción.....	7
Historia de la genética forense	7
Marcadores genéticos	9
Marcadores fenotípicos	11
Aspectos legales y éticos del uso de marcadores fenotípicos	15
Objetivos	16
Revisión	17
Inicios en la estimación de la edad en estudios forenses	17
La metilación del ADN: marcador epigenético	20
Métodos analíticos de la metilación del ADN	23
Técnicas predictivas basadas en la metilación del DNA	26
Discusión	29
Futuro de la estimación de la edad de un individuo	29
Conclusiones.....	30
Agradecimientos	31
Bibliografía.....	31

Resumen

La identificación de un individuo mediante estudios genéticos es uno de los puntos clave en la investigación forense. La técnica utilizada actualmente es el análisis de marcadores genéticos mediante la comparación con una muestra de referencia, pero el estudio de los marcadores fenotípicos, sobretodo los marcadores informativos de la edad de un individuo, son un campo en actual desarrollo. La ventaja que presentan estos marcadores es que permiten conocer características intrínsecas y extrínsecas sin la necesidad de tener muestras con las que realizar comparaciones.

Centrándonos en la determinación de la edad con fines forenses, se ha observado que los patrones epigenéticos están relacionados con el envejecimiento, concretamente la metilación del ADN. A partir de diversos estudios, se ha demostrado que existe una relación directa entre el nivel de metilación de las citosinas de las islas CpG y el paso de los años. Existen diferentes métodos de análisis de la metilación los cuales se basan en un pretratamiento del ADN, destacando la conversión por bisulfito, y en técnicas de evaluación del perfil de la metilación, destacando los ensayos SNaPshot®, entre otros. Además, a partir de todas estas técnicas, se han ido construyendo modelos predictivos basados en el estudio de diferentes biomarcadores para la estimación de la edad a partir de la metilación del ADN. La mayoría de las técnicas predictivas se utilizan para muestras sanguíneas y, por ello, es importante realizar estudios preliminares de nuevos métodos para otro tipo de vestigios biológicos.

Finalmente, cabe destacar la importancia de los avances en genética forense, ya sea para mejorar las técnicas para obtener resultados más precisos o porque aún hay muchas preguntas sin respuesta. Así mismo, destaca la importancia de consensuar análisis de ADN globales para facilitar las investigaciones policiales.

Palabras clave: marcadores fenotípicos, edad, epigenética, metilación, ADN.

Abstract

Individual identification through genetic studies is one of the key points in forensic investigation. Current technique used is the analysis of genetic markers by comparison with a reference sample, but phenotypic markers studies, especially informative markers of individual age, are being developed nowadays. The advantage is the fact that these markers allow us to identify intrinsic and extrinsic characteristics without needing samples to compare with.

Focusing on age determination for forensic purposes, epigenetic patterns have been found to be related to ageing, specifically DNA methylation. It has been shown, from different studies, that there is a direct relationship between the level of cytosines' methylation of the CpG islands and the passage of time. There are different methylation analysis methods which are based on DNA pre-treatment, highlighting bisulfite conversion, and on methylation profile evaluation techniques, highlighting SNaPshot® assays, among others. Furthermore, based on the different techniques, predictive models have been built based on biomarkers for estimating age from DNA methylation studies. Most of these predictive techniques are used for blood samples and, therefore, it is important to carry out preliminary studies of new methods for other biological traces.

Finally, it is worth highlighting the importance of advances in forensic genetics, either to improve techniques to obtain more precise results or because there are still many unanswered questions. Likewise, it highlights the importance of reaching a consensus on global DNA analyses to facilitate police investigations.

Key words: phenotypic markers, age, epigenetic, methylation, DNA.

Abreviaciones

ADN – Ácido desoxirribonucleico

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

SSO – Oligonucleótidos específicos de secuencia

STR – *Short tandem repeats*

pb – Pares de bases

FBI – *Federal Bureau of Investigation*

CODIS – *Combined DNA Indexing System*

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

BGA – Origen biogeográfico

AIM – Marcadores informativos de ancestralidad

InDels – Inserciones / Deleciones

EVC – Características visibles externas

mtADN – ADN mitocondrial

ROS – Especies reactivas de oxígeno

AGE – Productos finales de la glicación avanzada

sjTREC – *Signal joint T-cell receptor rearrangement excision circle*

SBE – *Single-base extention*

ddNTP – Didesoxinucleótido

MPS – Secuenciación masiva paralela

mADN – ADN metilado

Introducción

El mundo de las ciencias forenses está cambiando a pasos agigantados y a pesar de que el estudio del ADN en esta disciplina es relativamente nuevo, con aproximadamente 25 años de historia, tiene un impacto muy grande en la justicia criminal. La genética forense se define como la subespecialidad de la Medicina Legal que permite resolver problemas judiciales basados en los conocimientos en genética. (1, 2)

Historia de la genética forense

Los inicios de la genética forense datan de 1900 gracias a la clasificación de los grupos sanguíneos ABO realizada por el patólogo austrohúngaro Karl Landsteiner en el artículo "*Anti-fermentative, lytic and agglutinating effects of blood serum and lymph*". A partir de esta clasificación, fueron caracterizados los marcadores de los grupos sanguíneos, así como los marcadores proteicos del suero sanguíneo, de forma que permitían la identificación o discriminación de ciertos perfiles. Cabe destacar que se trata de una técnica limitada para la exclusión completa de perfiles debido a la gran cantidad de muestra biológica necesaria. (1, 3 – 5)

En 1910, el criminólogo francés Edmond Locard propone que "cada contacto deja una huella", lo cual será conocido como el Principio de Locard. Este principio propone que todo culpable de un hecho deja algún tipo de material en el cuerpo de la víctima, generalmente muestras biológicas o fluidos corporales. (5 – 7)

En 1926, el genetista estadounidense Thomas Hunt Morgan propuso la "Teoría de los Genes" donde concluyó la existencia de herencia ligada al sexo de algunos caracteres, así como que algunos otros caracteres podían residir en cromosomas específicos, mediante sus estudios con *Drosophila melanogaster*. Esta teoría genera una base en la que se desarrolla la genética forense. (5, 8)

En 1953, con la divulgación del descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN, en la revista *Nature* por el físico británico Francis Crick y el biólogo estadounidense James Watson, se inició la investigación en genética forense a nivel molecular. (5, 9)

En los años 60 y 70, se realizaron diferentes avances en la biología molecular que permitieron examinar las secuencias de ADN (1). Dentro de estos avances podemos destacar:

- El bioquímico Frederick Sanger junto con Alan Coulson desarrollaron diferentes técnicas. En 1973 consiguieron determinar una secuencia de ADN del fago f1 mediante la extensión de octadeoxiribonucleótido sintético por ADN polimerasa I de *Escherichia coli* marcado con trifosfatos radioactivos (10). En 1975 desarrollaron un método más rápido para determinar secuencias de nucleótidos en ADN de cadena simple. En este caso determinaron la secuencia del ADN del bacteriófago ϕ X174 mediante la extensión de oligonucleótidos sintéticos utilizando ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y ADN polimerasa del bacteriófago T4 bajo las condiciones de nucleósidos trifosfato limitantes y separando los productos en geles de acrilamida (11). En 1977 describieron un nuevo método, parecido al anterior, pero en este caso se utilizaron análogos del deoxinucleósido trifosfato, es decir, se usaron 2',3'-dideoxi y arabinonucleósidos que actuaban como inhibidores de los terminadores de la cadena de la ADN polimerasa (12). Este método es el conocido Método Sanger, el cual ha ido evolucionando con los años permitiendo su automatización.
- El biólogo molecular Edward Southern desarrolló, en 1975, un método basado en la separación de los fragmentos de ADN en un gel de agarosa de acuerdo con su tamaño a lo largo de un campo eléctrico (13). En 1978, se utiliza esta técnica, llamada *Southern blotting*, para el estudio de polimorfismos en el ADN (14) y, en 1980, se secuenció el primer locus polimórfico y se observó que las diferencias de los fragmentos de ADN se debían a los diferentes tamaños de estos (15).

En 1984, el genetista británico Sir Alec John Jeffreys descubrió que la diferencia de tamaño de los alelos entre diferentes personas se debía a la repetición en tándem de pequeños fragmentos de ADN. Estas repeticiones en tándem pasaron a llamarse minisatélites y la capacidad de detectar estas variaciones permitía la creación de perfiles genéticos únicos de cada individuo. Así pues, la hipervariabilidad del loci de los minisatélites comenzó a utilizarse con fines

forenses para la identificación de individuos involucrados en violaciones, generalmente, aunque tenía otras aplicaciones como las pruebas de paternidad. La técnica desarrollada por Jeffreys consiste en la extracción del ADN, seguida de disociación de la zona de interés utilizando enzimas de restricción para, posteriormente, cargar las muestras en un gel de electroforesis de agarosa, *Southern blotting* e hibridación para detectar el loci polimórfico. El resultado obtenido es lo que se conoce como '*fingerprint*' o perfil genético. (5, 16 – 18)

El análisis de los minisatélites era una técnica que tenía limitaciones importantes: la necesidad de mucha cantidad de muestra, la rápida degradación del ADN... Esta técnica era muy utilizada, a pesar de los inconvenientes, pero, finalmente, se sustituyó por el desarrollo, en 1986, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por el bioquímico estadounidense Kary Mullis. La técnica de la PCR permite la amplificación de secuencias específicas del ADN mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos que flanquean dichas regiones de interés. La PCR, además, presenta otras ventajas: la necesidad de poca cantidad de muestra (con unas pocas células somos capaces de generar un perfil) así como su rapidez, la capacidad de trabajar con ADN degradado y la capacidad de trabajar con cualquier zona polimórfica del ADN, siempre y cuando contemos con los cebadores correspondientes. (5, 19)

La primera aplicación de la PCR en estudios forenses se llevó a cabo en 1991. La técnica se basa en la hibridación de oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) para detectar las variaciones de las secuencias de ADN de interés ya amplificado mediante PCR. En este caso, se utilizó para el estudio de variaciones en las regiones de control de las secuencias de ADN mitocondrial humano. Se eligen estas regiones debido a que es la mayor porción no codificante del genoma e incluye el origen de replicación, los dos orígenes de transcripción y la región D-loop. (20)

Marcadores genéticos

Con el incremento de la población mundial y la expansión de los centros de población, la cantidad de crímenes cometidos aumentó de forma considerable en 1990, sobretodo en los Estados Unidos (21). A nivel mundial, en 1990, se

produjeron 360.935 homicidios intencionados (ratio 6,8/100.000 habitantes) y en Estados Unidos, 23.438 homicidios intencionados (ratio 0,6/100.000 habitantes) (22). El incremento de los crímenes violentos se reflejó en un aumento de las evidencias basadas en fluidos corporales y, por ello, las técnicas de análisis del ADN siguieron evolucionando. De esta forma, se empezaron a analizar los ‘*short tandem repeats*’ (STR) o microsatélites como marcadores genéticos, ya que consisten en regiones del ADN donde un fragmento de 2 – 6 pb se repite en tándem, se encuentran en las zonas no codificantes del ADN y presentan una tasa de mutación entre 10^{-3} y 10^{-5} (Figura 1). Estos marcadores genéticos son utilizados como herramienta de elección en identificación humana. Así pues, tanto en Estados Unidos como en Reino Unido comenzaron a desarrollarse kits de amplificación de STR que permitían el estudio de diferentes loci. Hoy en día, estos kits permiten realizar un análisis multiplex de entre 15 y 20 loci al mismo tiempo, gracias a los marcadores fluorescentes de cuatro colores, e incluso hasta 30 loci, gracias a los marcadores fluorescentes de seis colores (1, 5, 21, 23).

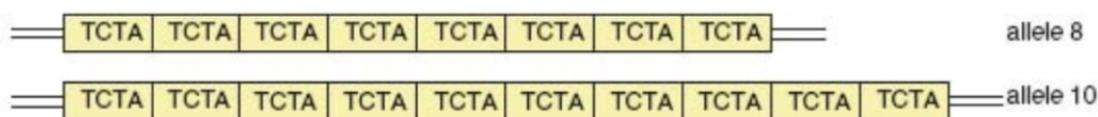


Figura 1. Estructura de un STR. En este caso, se trata de la estructura de dos alelos diferentes del locus D8S1179. El número del alelo corresponde con el número de repeticiones. (1)

Para aprovechar el máximo potencial de los STR, los laboratorios del FBI (Estados Unidos) crearon una base de datos nacional basada en el estudio de 13 loci de STR. Esta base de datos se llamó ‘*Combined DNA Indexing System*’ o CODIS y los loci que se estudian son: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX y vWA. Posteriormente, se añadieron loci adicionales que son: D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 and D22S1045, haciendo un total de 21 locis STR. Además, se realizaron estudios de los kits disponibles para comparar la eficacia de éstos y se observó que los kits comerciales *AmpFiSTR Profiler*, *Profiler Plus*, *COfiler*, *Blue*, y *Green 1* y *GenePrint PowerPlex* eran todos válidos y daban resultados concordantes. Aunque todos estos kits se utilizan únicamente para el estudio de STR autosómicos, también existen kits para el estudio de STR del cromosoma Y o para la secuenciación del ADN mitocondrial. Asimismo, se llevaron a cabo investigaciones en los grupos de población

principales (afroamericanos, caucásicos estadounidenses, hispanos, asiáticos del lejano oriente y nativos americanos) para tener unos datos sólidos para realizar estimaciones de la frecuencia de los STR en la población. (24 – 27)

Finalmente, existe otro tipo de marcadores genéticos que son los ‘*single nucleotide polymorphism*’ (SNP). Los SNP consisten en diferencias de una única base en un fragmento del ADN (Figura 2). Los SNP presentan una tasa de mutación de 10^{-8} , mucho menor que los STR, su tipificación puede realizarse de forma muy rápida y multiplex y los productos de amplificación de los SNPs son pequeños, lo que implica que los SNP serían una buena solución para el análisis de muestras de ADN degradado. Pero, también presentan algunas desventajas como la incapacidad de detectar mezclas y la ausencia de una base de datos como el CODIS. Generalmente, los SNP se utilizan cuando hay muestras de ADN muy degradado o hay poca cantidad de muestra (por ejemplo, en una masacre) y no se han obtenido resultados concluyentes mediante el estudio de los loci STR para la identificación de los cuerpos (en el 11M se utilizó esta técnica de identificación). Asimismo, los SNP del cromosoma Y y del ADN mitocondrial incrementan la cantidad de información en análisis de parentesco. (1 – 2, 27 – 29)



Figura 2. Estructura de un SNP. En esta secuencia se observa una alteración de la secuencia en la cuarta base () de los alelos. (1)*

Marcadores fenotípicos

Los marcadores genéticos, como se ha visto anteriormente, son los más utilizados actualmente en Genética Forense, pero tienen un inconveniente, la necesidad de disponer de un perfil con el que comparar los resultados. Por tanto, ¿qué ocurriría si no se dispone de una muestra de referencia del sospechoso o persona desaparecida ni se obtiene ninguna coincidencia en las bases de datos del ADN? Aquí es donde entran en acción los marcadores fenotípicos que, aunque también son marcadores genéticos en su mayoría, tienen una aplicación diferente.

Los marcadores fenotípicos son los marcadores del genoma humano que contienen información de las características tanto extrínsecas como intrínsecas de los individuos. Los marcadores fenotípicos se pueden clasificar en tres grupos:

- **Marcadores informativos de origen biogeográficos (BGA)**

Es la característica intrínseca heredada de los ancestros biológicos de un individuo. Consiste en diferencias en el ADN heredadas de los ancestros debidas a mutaciones, migraciones, selección local, aislamiento genético, entre otros. Es por ello por lo que hay alelos de los marcadores del ADN que únicamente se encuentran en ciertos grupos poblacionales de una región particular o son muy comunes o raros en diferentes regiones geográficas. Estos marcadores genéticos se llaman Marcadores Informativos de Ancestralidad o AIM.

Los AIMs abarcan polimorfismos como los STRs, SNPs e InDels (inserciones / deleciones). Los STR, en este caso, no son muy útiles ya que no presentan diferencias muy marcadas entre las poblaciones, a diferencia de los SNPs e InDels, los cuales son más estables generacionalmente y, al tener carácter bialélico, cada alelo se presenta más en unas poblaciones u otras. Además, los AIM únicamente se pueden heredar de forma autosómica, es decir, se obtienen la información biogeográfica de ambos progenitores.

El análisis de AIMs diferentes permite, por tanto, determinar a nivel continental si la persona a la que pertenece la muestra procede de Europa, África Subsahariana, Este de Asia, Sur de Asia, Oceanía o Nativo America. Pero, a pesar de todos estos avances, presenta algunas limitaciones: la necesidad de más poblaciones de referencia en las bases de datos, así como la dificultad de identificar la ancestralidad de un individuo con antecesoros de diferentes regiones geográficas. (30 – 35)

- **Marcadores informativos de características visibles externas (EVC)**

Son las características extrínsecas del ser humano, es decir, aquellas que se observan a simple vista como el color y la morfología del cabello, el color de los ojos, el tono de piel, la altura, los rasgos faciales, entre otros.

De los EVC, el primero en estudiarse fue el género, mediante el estudio de la amelogenina ya que el cromosoma X y el Y presentan una secuencia con diferencia de 6pb, lo que permite diferenciar si el género biológico es masculino o femenino.

Los polimorfismos SNPs o InDels que se encuentran en las regiones codificantes y reguladoras del ADN son las que afectan a las diferentes características externas de las personas, aunque también se ven influenciadas por los factores ambientales como la edad, radiación solar... Aunque encontramos caracteres más complejos a la hora de la predicción de EVC, los de menor complejidad son los relacionados con la pigmentación humana, es decir, con la melanina (eumelanina, tonalidades oscuras, y feomelanina, tonalidades rojizas y amarillas). Es por ello por lo que el desarrollo de modelos predictivos de estos pigmentos es necesario en el punto de vista de los estudios forenses. Cabe destacar que estos modelos predictivos no tienen que depender únicamente de la ancestralidad, ya que también afectan, como hemos comentado anteriormente, factores no genéticos.

Los EVC más utilizados en el estudio forense son:

- Color de ojos: el iris puede ser de muchos colores, desde el azul al marrón o negro, pasando por colores grises, verdes... La diferencia de color se debe a la cantidad de melanina de forma que los ojos azules presentan menor cantidad de melanina y los negros, mayor. Los seis marcadores SNPs más importantes en el estudio del color de ojos son HERC2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, TYRP1 y IRF4 (36), aunque se han desarrollado modelos predictivos que estudian 13 SNPs (37).
- Color del cabello: con el pelo ocurre lo mismo, los cabellos oscuros presentan mayor cantidad de eumelanina y los cabellos rubios y pelirrojos presentan mayor cantidad de feomelanina. Algunos de los marcadores más importantes en el estudio del color del cabello son SLC45A2, SLC24A5 y HERC2, aunque se han desarrollado modelos predictivos que estudian hasta 24 SNPs (38). A pesar de esto, las tasas de éxito en las predicciones son más elevadas con

el color de ojos que con el del pelo, debido a que este último tiende a variar con los años.

- Color de la piel: este estudio es el más complejo ya que la variación de la pigmentación se ve afectada por una respuesta evolutiva a la luz ultravioleta. A pesar de esta limitación se han desarrollado modelos predictivos de hasta 41 SNPs (39), destacando la importancia de los genes SLC24A5 HERC2 y SLC45A2, que se encuentran más expresados en las poblaciones mixtas.
- Morfología del cabello: la alopecia tiene una heredabilidad del 80%, aproximadamente. A partir de los tres genes TCHH, WNT10A y FRAS1 (40), se han desarrollado modelos predictivos que llegan hasta los 15 marcadores, pero su capacidad predictiva no es muy elevada. Respecto a la calvicie masculina, el gen AR/EDA2R presente en el cromosoma X es el que ha demostrado estar más implicado en la aparición de la alopecia (41).
- Estatura: también presenta una heredabilidad del 80%. En 2014, algunos estudios concluyeron que había más de 180 marcadores genéticos implicados en la variabilidad de la altura de las personas (42). También cabe destacar que se puede ver influida por malos hábitos durante la gestación, hormonal o ambientalmente.
- Rasgos faciales: es uno de los mayores objetivos de la predicción fenotípica forense ya que permitiría la elaboración de retratos genético-moleculares del donante de la muestra. Actualmente, existen modelos predictivos de 24 SNPs, donde algunos de los principales marcadores son PAX3, PRDM16 y TP63 (43). Mediante estas predicciones se quiere obtener información respecto a la nariz, los labios, la forma de la cara, la mandíbula, la barbilla y la cresta supraorbital.

El estudio y avance en las EVCs es muy importante para poder crear retratos de las personas, pero, debido a que muchas de estas características varían con el paso de los años, es importante tener

herramientas para determinar la edad de los individuos (30 – 32, 34, 44 – 45).

- **Marcadores informativos de la edad de un individuo**

Como bien hemos comentado anteriormente, el proceso de envejecimiento de las personas se puede observar por las alteraciones en las características externas, así como por la pérdida progresiva de la capacidad física. El proceso de envejecimiento es un campo de estudio muy importante en las ciencias forenses (además de otras ramas de la ciencia, pero no entraremos en ello) ya que cambios epigenéticos como la metilación del ADN podrían permitirnos estimar la edad de un individuo.

Debido a la gran importancia de la estima forense de la edad, este trabajo se centrará en el estudio de los factores epigenéticos centrados en la metilación del ADN como marcadores para evaluar la edad de una persona (30 – 31, 46).

Aspectos legales y éticos del uso de marcadores fenotípicos

Respecto a los aspectos legales, muchos países todavía no han regulado el uso de marcadores para obtener características fenotípicas de los individuos. En el contexto legal todo se basa en la diferencia entre marcadores de ADN de las regiones codificantes y las no codificantes. Legalmente, el uso de marcadores genéticos de regiones no codificantes no genera ningún problema, la discusión viene respecto a los marcadores de las regiones codificantes, ya que se estaría incurriendo en una invasión de la privacidad. En España, la regulación legislativa que existe regula, sobretodo, el Consentimiento Informado del sospechoso, a no ser que exista una orden judicial que permita la recogida de muestras de referencia, pero no trata temas sobre el uso de marcadores fenotípicos. Pero, a pesar de que no regula esto último, se realizan estudios sobre BGA, EVC y edad, ya que no está prohibido, pero no se permite la introducción de esta información en ninguna base de datos.

El otro aspecto importante es el ético. Los expertos ven ciertos riesgos en el uso de marcadores fenotípicos en los estudios forenses como discriminación a minorías étnicas, invasión de la privacidad, conflicto con las leyes de protección

de datos y el desconocimiento y expectativas exageradas por parte de la población. El que más preocupa es la discriminación a las minorías étnicas ya que todavía vivimos en una sociedad donde el racismo y la xenofobia están a la orden del día. Pero, a pesar de todo esto, el hecho de poder definir caracteres intrínsecos o extrínsecos (ancestralidad, características externas y edad) ayudan a las autoridades en la identificación de los implicado en un crimen. (31 – 32, 44, 47 – 48)

Objetivos

El objetivo principal de esta revisión es estudiar los diferentes mecanismos de determinación de la edad en un individuo a partir de datos genéticos, así como entender todos los conceptos que se involucran en estas investigaciones y defender la necesidad de avances en esta materia debido a la importancia que tiene la misma en la identificación de personas.

Revisión

Inicios en la estimación de la edad en estudios forenses

En el estudio forense, la estima de la edad de un individuo es muy importante ya que contribuye a la identificación de personas en diferentes ámbitos. En los inicios de la aplicación de este tipo de técnicas, la estimación de la edad se realizaba únicamente a restos mortales mediante el estudio de los huesos y los dientes. En estos casos existían muchos métodos diferentes basados en el tipo de hueso estudiado, pero, generalmente, estos métodos se basaban en el estudio de crecimiento esquelético (en caso de jóvenes), sínfisis del pubis, superficie auricular, costillas, suturas craneales, entre otros. (30, 49 – 50)

Posteriormente, se empezaron a aplicar estos métodos también para la estimar la edad de individuos vivos. Para ello, se utiliza la combinación del uso de rayos X en la mano y de la mandíbula con examen visual de la dentadura y examen físico. Además, si con ello no se obtienen resultados concluyentes se realiza rayos X o tomografía computarizada en las clavículas. (51 – 52)

El uso de las técnicas basadas en estudios físicos de los sujetos presentaba ciertos inconvenientes, destacando errores en la estimación de la edad debidos a alteraciones del crecimiento normal de una persona. Estas alteraciones pueden deberse tanto a enfermedades crónicas como a mala alimentación durante el desarrollo (presencia de deficiencias nutricionales), entre otros. (49)

Con el paso del tiempo y los avances tecnológicos, comenzaron a desarrollarse técnicas basadas en la alteración de ciertas biomoléculas. Estas técnicas estudian:

- **Deleciones en el ADN mitocondrial (mtADN)**

Las deleciones en el mtADN se tratan de eventos estocásticos que se relacionan con el envejecimiento. Este tipo de deleciones nucleotídicas se encuentran relacionadas con un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS o radicales libres) debidos a una falta de capacidad de realizar la fosforilación oxidativa por parte de la mitocondria. Por tanto, el daño oxidativo juega un papel esencial en la mutagénesis mitocondrial que llevaría a la deleción de nucleótidos del mtADN. (53 – 54)

Centrándonos en el estudio forense, el tipo de deleción más común y abundante es la deleción 4977 pb. Las ventajas que presenta esta técnica es que se puede utilizar diferentes tipos de tejidos para realizar el análisis, pero tiene como inconveniente que únicamente se pueden analizar muestras de individuos mayores de 20 años y como resultado únicamente se puede determinar un intervalo amplio de edad. (53, 55 – 56)

- **Acortamiento de la longitud de los telómeros**

Los telómeros son estructuras de nucleoproteínas localizadas en los cromosomas de células eucariotas. El tamaño de los telómeros se va reduciendo con el envejecimiento debido a fallos en las vías de reparación del ADN telomérico y genómico. Esto se debe a que la ADN polimerasa no realiza las reparaciones necesarias en la fase S del ciclo celular. Además, también se puede ver afectado por el estrés oxidativo.

Centrándonos en la determinación de la edad en el ámbito forense, es recomendable utilizar esta técnica junto con la anteriormente citada para obtener resultados más concluyentes. Esta técnica también se puede utilizar en diferentes tipos de tejidos, pero únicamente determina rangos de edad y los resultados pueden verse afectados por factores ambientales y genéticos, así como por la presencia de enfermedades, como enfermedades coronarias o anemia. (53, 57 – 59)

- **Racemización del ácido aspártico**

En la síntesis proteica en mamíferos únicamente se incorporan L-aminoácidos. Durante el curso de los años, estas formas L de los aminoácidos se transforman por racemización a D-aminoácidos. Así pues, uno de los aminoácidos que permite el estudio de la edad de un individuo es el ácido aspártico ya que la cantidad de D-ácido aspártico aumenta con el paso de los años.

Por lo tanto, esta técnica es muy útil ya que permite correlacionar la cantidad de D-ácido aspártico con la edad a partir de restos dentales, donde los resultados obtenidos son bastante concluyentes, aunque también se puede utilizar en el estudio de restos óseos (osteocalcina) y cartílagos, ligamentos y piel (elastina). Aunque esta técnica también

presenta los resultados en un intervalo de edad relativamente preciso (± 3 años), presenta como inconveniente principal su difícil aplicación en cadáveres mal conservados o dañados (por ejemplo, quemados). Además, también se puede ver afectado por las condiciones ambientales, como pH, temperatura o humedad. (53, 60 – 62)

- **Productos finales de la glicación avanzada (AGE)**

Los AGEs son grupos complejos y heterogéneos de compuestos formados por reacciones no enzimáticas de reducción de azúcares con grupos amino en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos mediante la reacción de Maillard. La cantidad de AGEs aumenta con el paso de los años en prácticamente todos los tejidos y lo hace tanto de forma endógena (producidos por el propio cuerpo) como exógena (obtenidos a partir de la dieta).

Respecto a sus aplicaciones en estudios forenses, los AGEs permiten la estimación de la edad en diferentes tipos de tejidos, pero con unos rangos de edad más amplios. Además, la cantidad de AGEs formados a lo largo de la vida se ve alterado por muchos factores como una generación de AGE acelerada en personas con diabetes o una acumulación en individuos con enfermedades renales. (53, 63)

- ***Signal joint T-cell receptor rearrangement excision circle (sjTREC)***

Los sjTRECs son moléculas circularizadas de ADN que resultan de la reestructuración del ADN de los linfocitos T. Con el paso de los años los niveles del sjTREC van bajando de forma considerable, sobretodo los niveles de $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$.

La aplicación de esta técnica es importante cuando no disponemos de información morfológica de individuo ya que las muestras utilizadas son sanguíneas. Como inconveniente, la precisión de esta técnica es moderada (± 9 años) y, además, la presencia de desordenes en el sistema inmune, generalmente producido por alguna enfermedad, interfiere en los resultados obtenidos. (64 – 65)

El estudio de las alteraciones de estas biomoléculas, así como la aplicación de estas técnicas contribuyó en gran medida en el avance de la determinación de

la edad con una connotación forense. Aún así, como hemos podido observar, estas técnicas presentan muchos inconvenientes. Es por eso por lo que otro tipo de estudios comenzaron a ganar importancia, como es el caso de la epigenética.

La metilación del ADN: marcador epigenético

El estudio de las secuencias del ADN es una de las herramientas más utilizadas en las ciencias forenses ya que nos permite desde la identificación de un individuo hasta determinar características fenotípicas. Gracias a las investigaciones realizadas en este ámbito se observó que las células sufrían modificaciones en los patrones epigenéticos asociados al envejecimiento. (30, 46)

Para empezar, la epigenética consiste en el estudio de las alteraciones heredables en las funciones de los genes o de un fenotipo celular causado por mecanismos que no modifican la secuencia del ADN. Así pues, los patrones o marcadores epigenéticos son cambios reversibles en la regulación de los genes que se heredan mitóticamente sin alterar la secuencia del ADN. Estos cambios pueden ocurrir durante el desarrollo, niñez o en la época adulta. Los patrones epigenéticos se clasifican en cinco grupos: remodelación nucleosomal, remodelación de la cromatina, ARN no codificante, modificaciones de las histonas (acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación, sumoilación y biotinilación) y metilación del ADN. Cabe destacar que estos no actúan individualmente, es decir, lo hacen mediante interacciones entre ellos o en cascada, dando lugar al epigenoma o código epigenético. El epigenoma, por tanto, es dinámico ya que se basa en una interacción entre el genoma y el medio ambiente. (30, 46, 64)

Desde el punto de vista técnico, de todos estos grupos de patrones epigenéticos, el más estudiado es la metilación del ADN. La metilación del ADN es un proceso bioquímico basado en la adición de grupos metilo en la posición 5' de los residuos de citosina (Figura 3a) que van seguidos de una guanina. Cabe destacar que la metilación de ADN esta relacionada con el silenciamiento génico, es decir, los genes se inactivan cuando la posición CpG está metilada y estos se expresan cuando no lo está (Figura 3b). (30, 46) Pero, a pesar de esto, la

metilación del ADN varía dependiendo de la región genómica, de tal forma que es muy abundante en elementos repetitivos y es menos común en lo que se conoce como islas CpG. Las islas CpG son regiones de entre 300 y 3000 pb ricas en citosina y guanina, es decir, con un contenido superior al 55% de guanina y citosina. (30, 46, 64, 66 – 67)

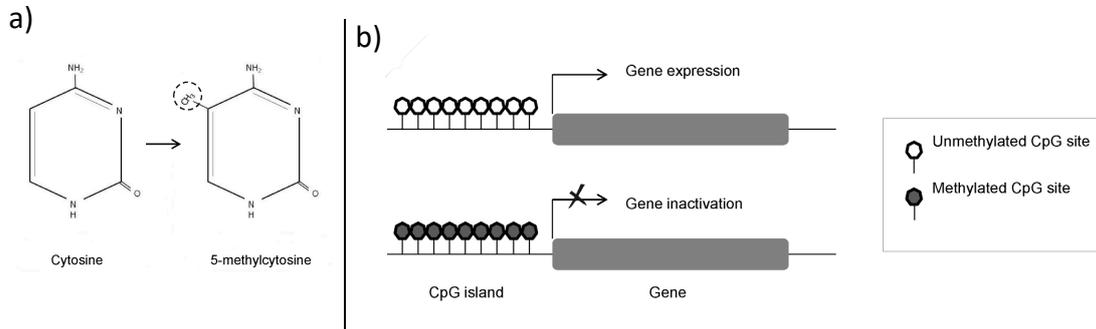


Figura 3. a) Metilación de la citosina. b) Representación de un gen que contiene islas CpG y representación del silenciamiento génico respecto a la metilación del ADN. (46)

Centrándonos en la aplicación de la metilación del ADN para la determinación de la edad, diversos estudios han determinado que los niveles de metilación del ADN en ciertas zonas específicas están relacionados con los cambios producidos con el envejecimiento. Uno de los estudios más significativos compara los niveles de metilación de los CpG entre recién nacidos y personas centenarias observándose que en CpG cercanos de los cromosomas 2 y 8, el individuo de 100 años presentaba menor metilación que los recién nacidos (Figura 4). De forma general, se observó que la metilación de CpG era de un 73% en personas centenarias respecto a un 80,5% en recién nacidos y un 77,8% de individuos de mediana edad (26 años). Además, en este estudio también se observó una diferencia en las regiones de metilación. Con todos estos datos, lo que se sugería es que, efectivamente, los metilomas del ADN eran distintos y trabajaban de forma muy diferente en ambos extremos de la vida humana. (68)

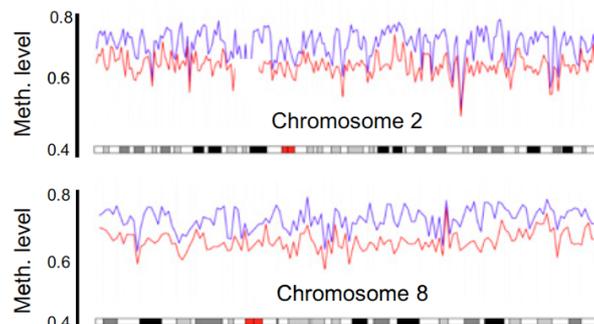


Figura 4. Ilustración gráfica de los niveles de metilación de los CpG en el cromosoma 2 y 8 de recién nacidos (línea azul) e individuos centenarios (línea roja). (68)

Actualmente, existen dos fenómenos que relacionan la metilación del ADN con la edad (Figura 5):

- **Deriva epigenética:** consiste en los cambios en la metilación del ADN que están asociados con la edad en un único individuo, es decir, no son comunes entre individuos.
- **Reloj epigenético:** consiste en la relación entre la edad y la metilación del ADN entre individuos, es decir, permite determinar los intervalos de edad de un individuo por estudios poblacionales. Este tipo de fenómeno se produce en regiones específicas del ADN, lo que permite desarrollar modelos predictivos en los cuales se utiliza la metilación del ADN como biomarcador epigenético.

Así pues, la deriva epigenética se encuentra influenciada por el ambiente y por los efectos estocásticos, de forma que, el estudio del reloj epigenético nos muestra resultados que reflejan la edad cronológica de forma más concluyente que métodos basados en el fenómeno de la deriva epigenética, que presenta resultados más discordantes. (30, 46, 69 – 70)

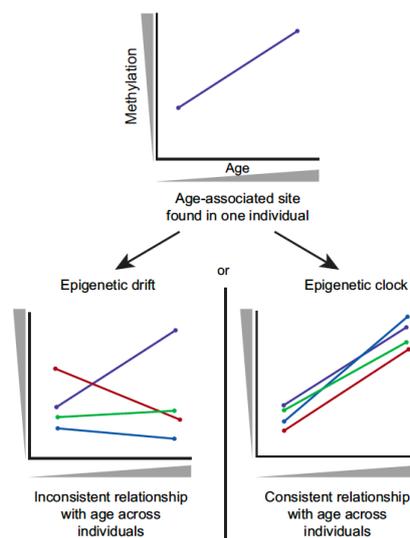


Figura 5. Representación esquemática de la deriva epigenética (izquierda) vs. el reloj epigenético (derecha). (62)

Por lo tanto, el uso de la metilación del ADN como biomarcador epigenético permite desarrollar modelos predictivos que se basen en el estudio del aumento o la disminución de la metilación de las islas CpG a lo largo de la vida del individuo. (30)

Métodos analíticos de la metilación del ADN

Diferentes tipos de métodos se han descrito para la detección y el análisis de la metilación del ADN. El primer paso consiste en el pretratamiento del ADN antes de su análisis y, las técnicas de pretratamiento que podemos utilizar en este tipo de estudios son:

- **Conversión de bisulfito**

Esta técnica de pretratamiento permite, de forma rápida, la identificación de las citosinas metiladas. Básicamente, esta técnica consiste en que el DNA genómico desnaturalizado de cadena simple se trata con bisulfito de sodio y, durante el proceso, los residuos de citosina no metilados se convierten en uracilo mientras que las citosinas metiladas no varían. Es la técnica de pretratamiento por excelencia debido a que permite la realización de análisis tanto cuantitativos como cualitativos de CpG concretos. (46, 64, 71)

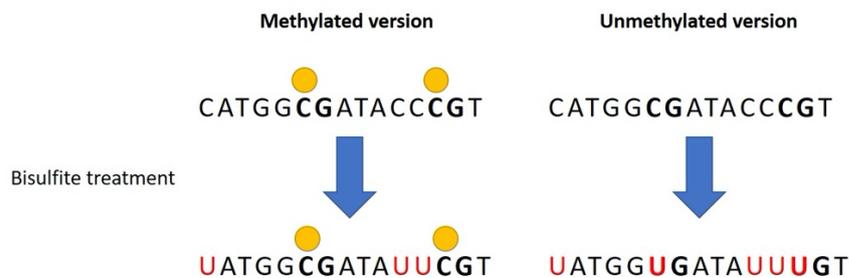


Figura 6. Conversión de bisulfito en secuencias de DNA metilado y no metilado.

- **Digestión enzimática**

Esta técnica se basa en el uso de enzimas de restricción que dependen de los sitios de metilación de los CpG de forma que puede ser utilizada para el estudio de la metilación del ADN. A pesar de que es una técnica sencilla, se pueden producir digestiones incompletas que afecten a la interpretación. (46)

- **Enriquecimiento de la afinidad – interacción proteica**

Esta técnica consiste en el enriquecimiento de las secuencias de ADN metilado vía anticuerpos contra la citosina metilada de forma que se aíslan los fragmentos de ADN que contienen citosinas metiladas. Así pues, para obtener estos fragmentos se utiliza la sonicación y la desnaturalización.

El inconveniente de esta técnica es la falta de especificidad y sensibilidad de forma que no podemos estudiar CpG concretos. (46)

Así pues, en el contexto del análisis forense, el tratamiento de conversión por bisulfito es el más apropiado ya que, a parte de que mantiene la integridad del DNA en las mejores condiciones posibles, no necesita una gran cantidad de muestra para poder utilizarse. Es por eso por lo que, antes de entrar en el segundo paso, es necesario saber que las técnicas posteriormente explicadas se basaran en un tratamiento de conversión por bisulfito previo.

Además, el segundo paso consiste en la aplicación de técnicas que nos permitan evaluar el perfil de la metilación del DNA. Durante muchos años se han utilizado técnicas como la pirosecuenciación, MiSeq y EpiTYPER (30). Estas técnicas han permitido el desarrollo de métodos predictivos, como veremos próximamente, pero, en este caso, nos vamos a centrar únicamente en técnicas más actuales, el desarrollo de las cuales se ha basado en las técnicas clásicas, y que están generando muy buenos resultados:

- **Técnica SBE y ensayos SNaPshot®**

La técnica SBE (*“single-base extention”*) consiste en la unión de un oligonucleótido que encajan con la secuencia que queda inmediatamente a continuación del sitio de interés y, posteriormente, se incorpora un terminador complementario marcado fluorescentemente (ddNTP) que alarga la cadena en un único nucleótido. Esta técnica se puede aplicar utilizando ensayos SNaPshot®, la cual nos permite obtener resultados cuantitativos ya que mide las señales de fluorescencia. Así pues, cuando la secuencia contenga una citosina metilada que se mantiene después de la conversión por bisulfito, se introducirá una guanina; en cambio, cuando la secuencia contenga una citosina no metilada que cambiará a uracilo después de la conversión por bisulfito, se introducirá una adenina. Además, los diferentes fluorocromos utilizados no presentan la misma intensidad lo que permite calcular con facilidad los porcentajes de metilación. Así pues, esta técnica se utiliza muy comúnmente en estudios forenses ya que permite la detección de múltiples CpG en una única reacción (Figura 7) y, además nos permite el estudio de las regiones de

interés, es decir, nos permite analizar los CpG específicos predictivos de la edad de un individuo. (64, 72 – 74)

- **Secuenciación masiva paralela (MPS)**

Esta técnica consiste en la amplificación de cientos de CpG de interés mediante el uso de *primers* específicos para DNA metilado de forma que se pueden analizar muchas zonas del DNA de forma simultánea. Posteriormente, también se indexan los CpG que se estudian de forma que facilitan el estudio cuantitativo mediante el uso de programario estadístico como el SPSS o el software estadístico R. A pesar de los buenos resultados que se han obtenido con esta técnica, todavía no esta muy desarrollada para la aplicación forense, pero se esta trabajando en su optimización y en la búsqueda de marcadores apropiados para que el trabajo sea lo más exhaustivo posible (Figura 7). (64, 72)

- **Ensayo *BeadChip* (EPIC)**

La tecnología *BeadChip* se basa en la capacidad de cuantificar la metilación del DNA a nivel de bases simples, pero en ensayos donde se asocian estos resultados con el epigenoma íntegro. Esta técnica permite la cuantificación del porcentaje de metilación de las regiones de CpG de interés. Es una técnica muy nueva y es por ello por lo que, mediante el estudio de esta, se está observando la posibilidad de encontrar nuevas regiones que permitan predecir la edad de un individuo de forma precisa. (64, 73, 75)

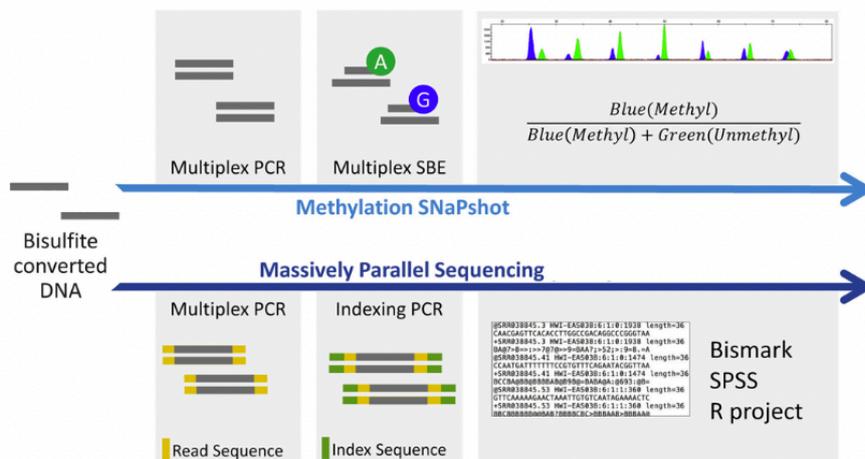


Figura 7. Diagrama del funcionamiento del estudio de la metilación del DNA mediante los ensayos SNaPshot® y MPS. (72)

Las ventajas que presentan estas técnicas es la capacidad de trabajar con poca cantidad de ADN y/o de mala calidad. Por ello, es importante implementar técnicas que permitan trabajar y obtener buenos resultados en condiciones no óptimas. De estas tres técnicas, la más utilizada y desarrollada hasta la actualidad es la SBE por SNaPshot®. A pesar de ello, cabe destacar que estas técnicas son principalmente utilizadas para el estudio de restos biológicos como la sangre y el semen. (72)

Técnicas predictivas basadas en la metilación del ADN

A partir de todas las técnicas y los conocimientos explicados previamente, se han ido construyendo modelos predictivos de la edad. Los resultados obtenidos por estos modelos predictivos pueden variar dependiendo de la técnica utilizada por lo que lo mejor es realizar test de los sets de marcadores con las diferentes técnicas y estimar la precisión de los mismos respecto a la edad real de los individuos a los que pertenece la muestra. Pero, la variabilidad no solo puede depender de la técnica utilizada, sino del tipo de tejido a analizar. (46, 66)

Para empezar, es muy importante tener en cuenta diferentes medias que se deben tener en cuenta para distinguir las ventajas de utilizar una técnica u otra con un tipo de resto biológico u otro (75):

- 1) **Correlación de la edad:** comparación entre la edad que se ha predicho mediante el estudio de la metilación del DNA (edad mADN) y la edad cronológica del individuo al que pertenecían las muestras.
- 2) **Error medio:** es la mediana absoluta de la diferencia entre la edad mADN y la edad cronológica. Por tanto, si tenemos un error de ± 4 años, implica que el 50% de los sujetos difieren en menos de 4 años de la edad mADN.
- 3) **Aceleración de la edad promedio:** es el promedio de la diferencia entre la edad mADN y la cronológica y se utiliza para comparar las edades mADN entre los diferentes tejidos. Es decir, de esta forma podemos determinar que tipo de tejido nos da resultados más precisos sobre la edad de un individuo utilizando una técnica concreta.

Teniendo en cuenta estas medidas, en los últimos 5 años han crecido de forma exponencial los modelos de predicción de la edad utilizando genes parcialmente superpuestos y la comunidad forense esta desarrollando una serie de consensos sobre los sitios CpG que mejor informen sobre la edad en diferentes tejidos, poblaciones, rangos de edad y tecnologías de análisis para crear así un sistema universal común. (64)

El hecho de que estudios no relacionados entre sí lleguen a resultados similares indica la importancia de ciertos genes en la inferencia de la edad. En las diferentes investigaciones realizadas se han encontrado fuertes correlaciones entre la metilación de dos sitios CpG en la región promotora del gen ELOVL2 y la edad del individuo al que pertenece la muestra. Con un único gen no es posible determinar la edad de forma precisa ni crear una técnica predictiva. Por ello, diferentes grupos de investigación han estado estudiando otros genes que, junto con el ELOVL2, puedan utilizarse como método predictivo en su conjunto. Así pues, se han ido creando muchos sistemas que tienen en común la presencia del gen ELOVL2 como uno de los biomarcadores principales de la estima de la edad. Esto se debe a que genera resultados tan precisos que mejora los resultados obtenidos al investigar otros genes predictivos. (30, 64)

Actualmente existen diferentes métodos predictivos, pero mayoritariamente han sido establecidos en relación con individuos en edad adulta, aunque existe un método predictivo centrado en 6 CpG que es exclusivo para infantes y adolescentes de entre 2 y 18 años (76). Uno de los inconvenientes por los cuales no existen sistemas predictivos para estas edades es debido a que los niveles de metilación de ciertos genes sufren cambios drásticos debido al desarrollo del sistema inmune. (30)

Dentro de los métodos predictivos actuales aplicados a edades adultas, se encuentran los siguientes: (30, 64)

- ITGA2B, ASPA y PDE4C (3 CpG) utilizando como técnica la pirosecuenciación y obteniendo un error o MAD (desviación mediana absoluta) de $\pm 5,43$ años. (77)

- ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C y TRIM59 (5 CpG) utilizando como técnica la pirosecuenciación y obteniendo un error de $\pm 3,4$ años. (78 – 79)
- ELOVL2, EDARADD, PDE4C y ASPA (4 CpG) utilizando como técnica la pirosecuenciación y obteniendo un error de $\pm 3,75$ años. (80 – 81)
- ADAR, AQP11, ITGA2B, PDE4C, ITGA2B y PDE4C (6 CpG) utilizando como técnica EpiTYPER y obteniendo un error de $\pm 2,8$ años. (82)
- ELOVL2, ZNF423 y CCDC102B (3 CpG) utilizando como técnica la pirosecuenciación y obteniendo un error de $\pm 3,16$ años. (83)
- ELOVL2, ASPA, PDE4C, FHL2, CCDC102B, C1orf132 y chr16:85395429 (7 CpG) utilizando como técnica EpiTYPER y obteniendo un error de $\pm 3,07$ años. (84)
- 8 CpG utilizando como técnica EpiTYPER y obteniendo un error de $\pm 5,09$ años. (85)
- 16 CpG, de los cuales destacan NHLRC1, SCGN y CSNK1D, utilizando como técnica MiSeq y obteniendo un error de $\pm 7,45$ años. (86)
- DDO, ELOVL2, F5, GRM2, HOXC4, KLF14, LDB2, MEIS1-AS3, NKIRAS2, RPA2, SAMD10, TRIM59 y ZYG11A (13 CpG) utilizando como técnica MiSeq y obteniendo un error de $\pm 3,21$ años. (87)

La mayoría de estos métodos de predicción únicamente se utilizan para muestras sanguíneas ya que, en el ámbito forense, suele ser el tipo de prueba biológica que, por excelencia, se suele encontrar en la escena de un crimen. A pesar de ello, también son importantes otros vestigios biológicos como el semen, la saliva, los huesos y los dientes. El inconveniente de estos modelos es que, como bien hemos comentado, no son aplicables a otro tipo de tejidos, aunque algunos de los genes son comunes para la sangre y la saliva. Respecto al semen, este tejido es más complejo por lo que se ha desarrollado un único modelo de predicción preliminar de 3 CpG en genes que no se han contemplado ni para la saliva ni para la sangre (88). Finalmente, los huesos y dientes son importantes tejidos a investigar ya que, a pesar de que solo se han realizado estudios preliminares, los resultados son prometedores (89). (30, 64)

Discusión

Los marcadores fenotípicos permiten conocer características genéticas del individuo al que pertenece la muestra, lo que contribuye positivamente a la investigación policial. Se puede analizar desde el origen biogeográfico hasta características físicas del donante, incluso pasando por la determinación de la edad.

Centrándonos en la determinación de la edad y respondiendo a la pregunta inicial: la edad no es solo un número. El envejecimiento genera cambios en nuestro ADN, como los niveles de metilación de las citosinas de las regiones CpG que permiten crear una correlación con la edad cronológica de un individuo. Esto ha generado una gran atención en este campo en los últimos años y ha permitido que se acelere el desarrollo de nuevas técnicas para uso forense.

Es destacable la gran importancia de seguir investigando en este campo. Actualmente, laboratorios de todo el mundo están realizando múltiples estudios para crear modelos predictivos basados en la información obtenida de los sitios CpG. La finalidad de estos estudios no es únicamente desarrollar sistemas nuevos de predicción sino crear sistemas de análisis de ADN consensuados globalmente para facilitar los trabajos de investigación. (30, 64)

Futuro de la estimación de la edad de un individuo

Aún queda mucho camino por delante y hay muchas preguntas que todavía no tienen una respuesta. Algunas de las cuestiones que quedan sin resolver serían (90 – 91):

- Actualmente todos los estudios que se han realizado se han basado en datos sobre poblaciones de células, pero ¿podría existir heterogeneidad en la metilación de las CpG entre células de un mismo tejido? De ser esto cierto algunas de las diferencias, aunque no muy elevadas, entre la edad cronológica y la edad mADN podrían deberse a esta heterogeneidad.
- ¿Afectan de forma muy considerable los factores ambientales en la metilación del DNA? ¿Podrían personas de la misma edad cronológica

presentar grandes diferencias en la edad mADN por las circunstancias en las que han vivido?

- ¿Cómo afectan las enfermedades sufridas al largo de la vida o en el propio momento del análisis a la estimación de la edad?
- ¿Podrían atrasar el envejecimiento las intervenciones pro-longevidad?
¿Afectaría esto a la metilación de las CpG?

Y, como estas, muchas más. Es por ello por lo que es muy importante mantener la investigación en este tipo de temas a la orden del día y fomentar su estudio.

Finalmente, cabe destacar que las aplicaciones de todo lo explicado anteriormente pueden extrapolarse a otros campos. Aún así, dentro de las ciencias forenses, su aplicación sería muy amplia e iría desde poder ayudar a la identificación de cuerpos o restos biológicos en grandes masacres (ataques terroristas, accidentes de grandes vehículos, catástrofes naturales) hasta resolver casos en los cuales no se tiene ningún sospechoso ni existen muestras con las que comparar los resultados.

Conclusiones

La determinación de ciertos aspectos fenotípicos con fines forenses es importante para contribuir a las investigaciones policiales y el hecho de generar retratos genéticos y fenotípicos permitiría la resolución de casos a nivel global. Además, el desarrollo de nuevos sistemas epigenéticos que permitan determinar la edad de un individuo a partir de diferentes tejidos biológicos es prioritario ya que facilitaría el estudio de las muestras y permitiría la obtención de resultados más precisos.

Agradecimientos

Este proyecto se ha llevado a cabo con la colaboración de la Dra. Ana M^a Freire Aradas del Instituto de Ciencias Forenses Luis Cocheiro (Santiago de Compostela, Galicia).

Me gustaría agradecerle a la Dra. Ana M^a Freire Aradas su ayuda en el desarrollo del trabajo y por lo aprendido en la redacción de este. Además, también me gustaría agradecerle al Dr. Santiago García Vallvé y al Dr. Raúl Beltrán Debón su confianza y, sobretodo, el haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto.

Bibliografía

- (1) Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An introduction to forensic genetics* (Vol. 2). John Wiley & Sons.
- (2) Carracedo, A., Salas, A., & Lareu, M. V. (2010). Problemas y retos de futuro de la genética forense en el siglo XXI. *Cuadernos de medicina forense*, 16(1-2), 31-35.
- (3) Yamamoto, F. I., & Hakomori, S. I. (1990). Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 19257-19262.
- (4) The Nobel Prize: Karl Landsteiner. Recuperado de <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1930/landsteiner/facts/> [Visitada: 05/05/2020]
- (5) Li, C. (2018). Forensic genetics. *Forensic sciences research*, 3(2), 103.
- (6) Locard, E. (1930). The analysis of dust traces. *Am. J. Police Sci.*, 1, 276.
- (7) Byard, R. W., James, H., Berketa, J., & Heath, K. (2016). Locard's principle of exchange, dental examination and fragments of skin. *Journal of forensic sciences*, 61(2), 545-547
- (8) Shine, I., & Wrobel, S. (2014). *Thomas Hunt Morgan: pioneer of genetics*. University Press of Kentucky.

- (9) Crick, F. H. C., & Watson, J. D. (1954). The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 223(1152), 80-96.
- (10) Sanger, F., Donelson, J. E., Coulson, A. R., Kössel, H., & Fischer, D. (1973). Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage f1 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(4), 1209-1213.
- (11) Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- (12) Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- (13) Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J mol biol*, 98(3), 503-517.
- (14) Kan, Y. W., & Dozy, A. M. (1978). Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(11), 5631-5635.
- (15) Wyman, A. R., & White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6754-6758.
- (16) Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79.
- (17) Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67-73.
- (18) Gill, P., Jeffreys, A. J., & Werrett, D. J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318(6046), 577-579.
- (19) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- (20) Stoneking, M., Hedgecock, D., Higuchi, R. G., Vigilant, L., & Erlich, H. A. (1991). Population variation of human mtDNA control region sequences

- detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American journal of human genetics*, 48(2), 370.
- (21) Caskey, C. T., & Edwards, A. O. (1994). *U.S. Patent No. 5,364,759*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (22) Victims of International homicide, 1990 – 2018. Recuperado de <https://dataunodc.un.org/content/data/homicide/homicide-rate> [Visitada: 13/05/2020]
- (23) Huang, Q. Y., Xu, F. H., Shen, H., Deng, H. Y., Liu, Y. J., Liu, Y. Z., ... & Deng, H. W. (2002). Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *The American Journal of Human Genetics*, 70(3), 625-634.
- (24) Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Smerick, J. B., & Budowle, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Science*, 46(3), 647-660.
- (25) Budowle, B., Shea, B., Niezgoda, S., & Chakraborty, R. (2001). CODIS STR loci data from 41 sample populations. *Journal of Forensic Science*, 46(3), 453-489.
- (26) Delgado, E., & Neyra, C. D. (2019). Allele frequencies of 21 autosomal STR markers in a mixed race Peruvian population applied to forensic practice. *Spanish Journal of Legal Medicine*, 45(3), 92-97.
- (27) Ministerio de Justicia. (2017). Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses 2016. Recuperado de: https://www.mjusticia.gob.es/cs/Satellite/Portal/1292429696767?blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadername2=Grupo&blobheadervalue1=attachment%3B+filename%3DInforme_y_recomendaciones_de_la_CTP_sobre_las_nuevas_tecnologias_de_analisis_genetico_y_nuevos_marc.PDF&blobheadervalue2=INTCF
- (28) Kidd, K. K., Pakstis, A. J., Speed, W. C., Grigorenko, E. L., Kajuna, S. L., Karoma, N. J., ... & Okonofua, F. (2006). Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic science international*, 164(1), 20-32.
- (29) Phillips, C., Fondevila, M., García-Magariños, M., Rodríguez, A., Salas, A., Carracedo, A., & Lareu, M. V. (2008). Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Science International: Genetics*, 2(3), 198-204.

- (30) Freire-Aradas, A., Arenas, M., Pinto, N. & Amorim, A. (2019). Marcadores fenotípicos de interés forense. En Crespillo Márquez, MC. & Barrio Caballero, PA. *Genética forense: del laboratorio a los Tribunales*. Díaz de Santos.
- (31) Marano, L. A., & Fridman, C. (2019). DNA phenotyping: current application in forensic science. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 9, 1-8.
- (32) Schneider, P. M., Prainsack, B., & Kayser, M. (2019). The Use of Forensic DNA Phenotyping in Predicting Appearance and Biogeographic Ancestry. *Deutsches Ärzteblatt International*, 116(51-52), 873.
- (33) Phillips, C. (2015). Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 49-65.
- (34) Butler, K., Peck, M., Hart, J., Schanfield, M., & Podini, D. (2011). Molecular “eyewitness”: Forensic prediction of phenotype and ancestry. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), e498-e499.
- (35) Frudakis, T. (2010). *Molecular photofitting: Predicting ancestry and phenotype using DNA*. Elsevier.
- (36) Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O., & Kayser, M. (2011). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 170-180.
- (37) Ruiz, Y., Phillips, C., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., De Cal, M. C., Cruz, R., ... & Carracedo, A. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 28-40.
- (38) Walsh, S., Chaitanya, L., Clarisse, L., Wirken, L., Draus-Barini, J., Kovatsi, L., ... & Branicki, W. (2014). Developmental validation of the HirisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 150-161.
- (39) Chaitanya, L., Breslin, K., Zuñiga, S., Wirken, L., Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., ... & Kayser, M. (2018). The HirisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Science International: Genetics*, 35, 123-135.
- (40) Pośpiech, E., Karłowska-Pik, J., Marcińska, M., Abidi, S., Andersen, J. D., van den Berge, M., ... & Sijen, T. (2015). Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 280-288.

- (41) Marcińska, M., Pośpiech, E., Abidi, S., Andersen, J. D., van den Berge, M., Carracedo, Á., ... & Skowron, M. (2015). Evaluation of DNA variants associated with androgenetic alopecia and their potential to predict male pattern baldness. *PLoS one*, 10(5), e0127852.
- (42) Allen, H. L., Estrada, K., Lettre, G., Berndt, S. I., Weedon, M. N., Rivadeneira, F., ... & Ferreira, T. (2010). Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*, 467(7317), 832-838.
- (43) Claes, P., Hill, H., & Shriver, M. D. (2014). Toward DNA-based facial composites: preliminary results and validation. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 208-216.
- (44) Kayser, M., & Schneider, P. M. (2009). DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Science International: Genetics*, 3(3), 154-161.
- (45) M'charek, A. (2020). Tentacular faces: Race and the return of the phenotype in forensic identification. *American Anthropologist*.
- (46) Vidaki, A., Daniel, B., & Court, D. S. (2013). Forensic DNA methylation profiling—potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 499-507.
- (47) Scudder, N., McNevin, D., Kelty, S. F., Walsh, S. J., & Robertson, J. (2018). Forensic DNA phenotyping: Developing a model privacy impact assessment. *Forensic Science International: Genetics*, 34, 222-230.
- (48) Samuel, G. & Prainsack, B. (2018). The regulatory landscape of forensic DNA phenotyping in Europe VISAGE. Recuperado de: http://www.visage-h2020.eu/PDF/Deliverable_5.1_for_posting_online_DECEMBER_2018.pdf
- (49) Franklin, D. (2010). Forensic age estimation in human skeletal remains: current concepts and future directions. *Legal Medicine*, 12(1), 1-7.
- (50) Baccino, E., & Schmitt, A. (2006). Determination of adult age at death in the forensic context. In *Forensic anthropology and medicine* (pp. 259-280). Humana Press.
- (51) Schmeling, A., Dettmeyer, R., Rudolf, E., Vieth, V., & Geserick, G. (2016). Forensic age estimation: methods, certainty, and the law. *Deutsches Ärzteblatt International*, 113(4), 44.

- (52) Schmeling, A., Geserick, G., Reisinger, W., & Olze, A. (2007). Age estimation. *Forensic science international*, 165(2-3), 178-181.
- (53) Meissner, C., & Ritz-Timme, S. (2010). Molecular pathology and age estimation. *Forensic science international*, 203(1-3), 34-43.
- (54) Elson, J. L., Samuels, D. C., Turnbull, D. M., & Chinnery, P. F. (2001). Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *The American Journal of Human Genetics*, 68(3), 802-806.
- (55) Wei, Y. H. (1992). Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 145-155.
- (56) Meissner, C., Von Wurmb, N., & Oehmichen, M. (1997). Detection of the age-dependent 4977 bp deletion of mitochondrial DNA. *International journal of legal medicine*, 110(5), 288-291.
- (57) Aubert, G., & Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiological reviews*, 88(2), 557-579.
- (58) Tsuji, A., Ishiko, A., Takasaki, T., & Ikeda, N. (2002). Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Science International*, 126(3), 197-199.
- (59) Mather, K. A., Jorm, A. F., Parslow, R. A., & Christensen, H. (2011). Is telomere length a biomarker of aging? A review. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 66(2), 202-213.
- (60) Alkass, K., Buchholz, B. A., Ohtani, S., Yamamoto, T., Druid, H., & Spalding, K. L. (2010). Age estimation in forensic sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(5), 1022-1030.
- (61) Waite, E. R., Collins, M. J., Ritz-Timme, S., Schutz, H. W., Cattaneo, C., & Borrman, H. I. M. (1999). A review of the methodological aspects of aspartic acid racemization analysis for use in forensic science. *Forensic science international*, 103(2), 113-124.
- (62) Arany, S., & Ohtani, S. (2011). Age estimation of bloodstains: A preliminary report based on aspartic acid racemization rate. *Forensic science international*, 212(1-3), e36-e39.

- (63) Greis, F., Reckert, A., Fischer, K., & Ritz-Timme, S. (2018). Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine: useful for age estimation?. *International Journal of Legal Medicine*, 132(3), 799-805.
- (64) Freire-Aradas, A., Phillips, C., & Lareu, M. V. (2017). Forensic Individual Age Estimation with DNA: From Initial Approaches to Methylation Tests. *Forensic science review*, 29(2).
- (65) Ou, X. L., Gao, J., Wang, H., Wang, H. S., Lu, H. L., & Sun, H. Y. (2012). Predicting human age with bloodstains by sjTREC quantification. *PloS one*, 7(8), e42412.
- (66) Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, 14(10), 3156.
- (67) Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412-1417.
- (68) Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., ... & Puca, A. A. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10522-10527.
- (69) Jones, M. J., Goodman, S. J., & Kobor, M. S. (2015). DNA methylation and healthy human aging. *Aging cell*, 14(6), 924-932.
- (70) Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences. *Molecular cell*, 71(6), 882-895.
- (71) Sasaki, M., Anast, J., Bassett, W., Kawakami, T., Sakuragi, N., & Dahiya, R. (2003). Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(2), 305-309.
- (72) Hong, S. R., Shin, K. J., Jung, S. E., Lee, E. H., & Lee, H. Y. (2019). Platform-independent models for age prediction using DNA methylation data. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 39-47.
- (73) Hong, S. R., Jung, S. E., Lee, E. H., Shin, K. J., Yang, W. I., & Lee, H. Y. (2017). DNA methylation-based age prediction from saliva: high age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Science International: Genetics*, 29, 118-125.

- (74) Kaminsky, Z., & Petronis, A. (2009). Methylation SNaPshot: a method for the quantification of site-specific DNA methylation levels. In *DNA Methylation* (pp. 241-255). Humana Press.
- (75) Alsaleh, H., & Hadrill, P. R. (2019). Identifying blood-specific age-related DNA methylation markers on the Illumina MethylationEPIC® BeadChip. *Forensic science international*, 303, 109944.
- (76) Freire-Aradas, A., Phillips, C., Girón-Santamaría, L., Mosquera-Miguel, A., Gómez-Tato, A., de Cal, M. Á. C., ... & Lareu, M. V. (2018). Tracking age-correlated DNA methylation markers in the young. *Forensic Science International: Genetics*, 36, 50-59.
- (77) Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., ... & Zenke, M. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome biology*, 15(2), R24.
- (78) Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Pałeczka, A., ... & Branicki, W. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 173-179.
- (79) Jung, S. E., Lim, S. M., Hong, S. R., Lee, E. H., Shin, K. J., & Lee, H. Y. (2019). DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 1-8.
- (80) Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S. C., Van de Voorde, W., & Decorte, R. (2015). Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, 10(10), 922-930.
- (81) Smeers, I., Decorte, R., Van de Voorde, W., & Bekaert, B. (2018). Evaluation of three statistical prediction models for forensic age prediction based on DNA methylation. *Forensic Science International: Genetics*, 34, 128-133.
- (82) Xu, C., Qu, H., Wang, G., Xie, B., Shi, Y., Yang, Y., ... & Feng, L. (2015). A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model. *Scientific reports*, 5, 17788.
- (83) Park, J. L., Kim, J. H., Seo, E., Bae, D. H., Kim, S. Y., Lee, H. C., ... & Kim, Y. S. (2016). Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Science International: Genetics*, 23, 64-70.

- (84) Freire-Aradas, A., Phillips, C., Mosquera-Miguel, A., Girón-Santamaría, L., Gómez-Tato, A., De Cal, M. C., ... & Pośpiech, E. (2016). Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Science International: Genetics*, 24, 65-74.
- (85) Zubakov, D., Liu, F., Kokmeijer, I., Choi, Y., van Meurs, J. B., van IJcken, W. F., ... & Lewin, J. (2016). Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Science International: Genetics*, 24, 33-43.
- (86) Vidaki, A., Ballard, D., Aliferi, A., Miller, T. H., Barron, L. P., & Court, D. S. (2017). DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, 28, 225-236.
- (87) Naue, J., Hoefsloot, H. C., Mook, O. R., Rijlaarsdam-Hoekstra, L., van der Zwalm, M. C., Henneman, P., ... & Verschure, P. J. (2017). Chronological age prediction based on DNA methylation: massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic Science International: Genetics*, 31, 19-28.
- (88) Lee, H. Y., Jung, S. E., Oh, Y. N., Choi, A., Yang, W. I., & Shin, K. J. (2015). Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 28-34.
- (89) Lee, H. Y., Hong, S. R., Lee, J. E., Hwang, I. K., Kim, N. Y., Lee, J. M., ... & Lee, Y. H. (2020). Epigenetic age signatures in bones. *Forensic Science International: Genetics*, 46, 102261.
- (90) Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences. *Molecular cell*, 71(6), 882-895.
- (91) Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., Bell, J. T., ... & Ideker, T. (2019). DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome biology*, 20(1), 249.