



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

MÀSTER EN GENÈTICA, FÍSICA I QUÍMICA FORENSE

TREBALL DE FI DE MÀSTER

LumiUCIO

Un nou reactiu de detecció de sang latent

Estudiant: Xavier Garrigós Panisello

Tutors professionals: Jose Manuel Mejuto Escudero

Tutor acadèmic: Raúl Beltrán Debón

Tarragona, Setembre 2021

Resum

Quan ens trobem davant de l'escena d'un crim, els investigadors busquen indicis per esbrinar el succeït i trobar el presumpte autor. Entre tots els possibles indicis que hi ha, uns dels que més informació permet obtenir és la sang, però primer s'ha de trobar i no sempre és fàcil, ja que pot haver estat netejada o trobar-se amagada per la superfície on s'ha dipositat. Per això a través dels anys s'han desenvolupat diferents tècniques per detectar la sang, una d'aquestes basada amb el luminol.

Quan el luminol és aplicat sobre una resta de sang latent produeix l'emissió de quimioluminescència en reaccionar amb l' H_2O_2 i l'hemoglobina. Existeixen molts reactius basats amb el luminol però tenen la principal desavantatge que necessiten la màxima foscor possible per observar la llum emesa, per tant, aquests reactius es troben en constant millora per tal d'augmentar la intensitat però sense malmetre l'apreciat DNA.

L'objectiu d'aquest treball és estudiar i comparar el LumiUCIO, una nova fórmula de producció pròpia de la Unitat Central d'Inspeccions Oculars de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra, per veure els possibles avantatges que pot presentar, enfront del reactiu Lumiscene que utilitzen actualment en la inspecció ocular tècnic policial (IOTP).

Per fer-ho s'han realitzat 3 estudis on s'ha observat la intensitat i la durada de la llum emesa pels reactius, i com aquests afecten a la quantitat i la qualitat del DNA extret en mostres de diferent antiguitat i en mostres processades a diferents temps després d'haver estat ruixades amb el reactiu.

Els resultats obtinguts han estat majoritàriament favorables per al LumiUCIO, no obstant, no han estat suportats per ninguna evidència estadística. Falten però, estudis complementaris que millorin el disseny experimental del treball afegint més variables i condicions per acabar de discernir el potencial del reactiu.

Paraules clau: Sang, luminol, quimioluminescència, DNA, STRs, qualitat.

Resumen

Cuando los investigadores se encuentran en una escena de un crimen su objetivo es encontrar indicios que ayuden a resolver el caso. Uno de los indicios que más información puede proporcionar es la sangre, pero no siempre es fácil de encontrar ya que puede haber sido limpiada o haber sido escondida por la superficie en donde se ha depositado. Por esta razón durante años se han desarrollado diferentes técnicas para detectarla, una de ellas se basa en el luminol.

Cuando el luminol es rociado sobre un resto de sangre latente produce la emisión de quimioluminiscencia cuando reacciona con el H_2O_2 y la hemoglobina. Existen muchos reactivos con el luminol como base, pero la necesidad de casi oscuridad total hace que estén en constante mejora para aumentar la intensidad de la luz emitida pero sin dañar el preciado DNA.

El objetivo del trabajo es estudiar i comparar el LumiUCIO, una nueva fórmula producida por la Unitat Central d'Inspeccions Oculars de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra, para ver las posibles ventajas que puede presentar frente al reactivo Lumiscene actualmente en uso en la IOTP.

3 estudios diferentes se han realizado para estudiar la intensidad y la duración de la luz emitida por los reactivos, y la cantidad y la calidad del DNA extraído en muestras de diferente antigüedad y en muestras procesadas a diferentes tiempos después de haber sido rociadas.

Los resultaos obtenidos han sido mayormente favorables para el LumiUCIO, pero no han sido apoyados por ninguna evidencia estadística. Entonces hacen falta estudios complementarios que mejoren el diseño experimental y añadan más variables y condiciones para acabar de discernir el potencial del reactivo nuevo.

Palabras clave: Sangre, quimioluminiscencia, DNA, STRs, calidad.

Abstract

When a criminal scene is found, the police search for evidences that could help to solve the case. Blood is one of the best evidence on a crime scene, but first it has to be found and is not always easy because it could be washed or hide by the surface where it is. To reveal it a lot of different techniques have been designed and one of them is based on luminol.

When luminol reagents are applied to blood it emits chemiluminescence when it reacts with H_2O_2 and haemoglobin. The principal disadvantage of this molecule is the need of nearly total darkness, that's why these reagents are constantly in development to improve the light emitted without damaging the valuable DNA.

The aim of this study is to evaluate and compare the LumiUCIO reagent, a new formula developed by the Unitat Central d'Inspeccions Oculars de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra, to see its possible advantages versus Lumiscene reagent which is used by the IOTP.

To assess it 3 different studies have been done to analyse the duration and the intensity of the light emitted, and the quantity and quality of the DNA extracted from the blood samples with different weeks and from samples processed in different days after the reagent was applied.

LumiUCIO shown better results than Lumiscene, but they were not supported by the statistic tests. Then new studies should be conducted improving the methods used and adding new variables and conditions to discern the potential of the reagent.

Keywords: Blood, chemiluminescence, DNA, STRs, quality.

Índex

1.	Introducció	5
1.1.	La sang.....	5
1.2.	La Fluoresceïna.....	6
1.3.	El luminol.....	7
1.3.1.	Bluestar (BS)	8
1.3.2.	Lumiscene (LCS).....	9
1.3.3.	LumiUCIO (LUO)	9
2.	Objectiu	10
3.	Metodologia	10
3.1.	Preparació dels reactius	10
3.2.	Disseny experimental	10
3.2.1.	Estudi 1: Intensitat i durada de la quimioluminescència	11
3.2.2.	Estudi 2: Degradació del DNA en mostres de diferent antiguitat	11
3.2.3.	Estudi 3: Degradació del DNA en mostres de sang exposades al reactiu durant diferents temps	12
3.3.	Extracció i quantificació del DNA i PCR de STRs.....	12
4.	Resultats i Discussions.....	13
4.1.	Estudi 1: Intensitat i durada de la quimioluminescència	13
4.1.1.	Comparació dels 3 reactius en la concentració de sang 1/1000.....	15
4.2.	Estudi 2: Degradació del DNA en mostres antigues.....	17
4.2.1.	Quantificació de DNA	17
4.2.2.	Qualitat del DNA.....	19
4.3.	Estudi 3: Degradació del DNA en mostres macerades amb el reactiu.....	24
4.3.1.	Quantificació de DNA	24
4.3.2.	Qualitat del DNA.....	25
5.	Conclusions	29
6.	Agraïments	30
7.	Bibliografia	32
8.	Annexos.....	34
8.1.	Codi Matlab del tractament de dades de l'Estudi 1	34
8.2.	Taules de dades de l'Estudi 2	37
8.3.	Taules de dades de l'Estudi 3	39

1. Introducció

1.1. La sang

Sempre que ens trobem davant d'una escena on s'ha produït un crim es busquen indicis per saber, què, com, quan, qui i per què ha succeït. Un dels indicis que es troben més sovint, sobretot en crims violents, és la presència de sang i/o indicis de que hagi estat netejada. La possibilitat de poder visualitzar i recollir aquesta sang ens pot donar informació essencial que pot ajudar a resoldre una investigació judicial, certificar o contradir el declarat pels testimonis, definir si un lloc és una possible escena d'un crim, relacionar un sospitós amb el lloc dels fets, redirigir la investigació en una nova direcció, saber com s'han generat segons el seu patró,... (Tobe, Watson, & Nic Daeïd, 2007))

La sang consta de 4 parts principals: 1) la primera és el plasma i constitueix la part aquosa on es troben suspeses la resta de components i la trobem formada per aigua, sucres, proteïnes, sals i àcids grassos entre d'altres; 2) Els eritròcits o glòbuls rojos són el component cel·lular majoritari representant el 40-45% de la sang. Són cèl·lules sense nucli que contenen l'hemoglobina encarregada de transportar l'O₂ i el CO₂, però també és la que reaccionarà amb els reactius de detecció de sang gràcies a la seva activitat pseudo-peroxidasa i el ferro que conté; 3) Els leucòcits o glòbuls blancs són cèl·lules nucleades que formen el sistema immunitari representant tan sols l'1%, d'aquestes serà d'on s'intentarà extreure el DNA per obtenir un perfil genètic, i per últim 4) les plaquetes, que són fragments cel·lulars encarregats del tamponament dels vasos sanguinis quan hi ha una ferida. (American Society of Hematology , 2021))

L'hemoglobina (Hb) és una hemoproteïna que té com a funció principal el transport d'O₂ dels pulmons fins les cèl·lules i de recollir el CO₂ produït per aquestes i retornar-lo als pulmons per expulsar-lo fora del cos. A més a més, quan l'Hb es troba en ambients amb estrès oxidant per a la cèl·lula pot actuar com una peroxidasa, el que evita que es produeixi l'oxidació de proteïnes i altres components cel·lulars i, per tant, ajuda a prevenir el dany cel·lular o, per al que importa als investigadors, pot catalitzar la reacció de descomposició del H₂O₂ en O₂ i aigua. [(Cheyne, 2011), (Kapralov, Vlasova, Feng, Maeda, & al., 2009)]

Quan la policia rastreja l'escena del crim en busca d'evidències, la sang serà una font molt valuosa d'informació, ja que la possibilitat d'extreure un perfil genètic permetrà individualitzar la mostra quan l'enfrontem contra un altra de coneguda. Aquesta comparació ens donarà el *Likelihood ratio*, un càlcul que ens dona el percentatge de que, donada una població a la qual pertany el sospitós, és més probable que el perfil trobat en l'escena del crim hagi sigut dipositat pel sospitós vers que ho hagi fet una persona aleatòria de la mateixa població.

El què permet relacionar una taca de sang amb un individu són els microsatel·lits o STRs (Small Tandem Repeats), que son repeticions seqüencials d'1 fins a 6 parells de bases, que generalment es repeteixen entre 5 i 50 vegades situats en regions no codificants del DNA. Al llarg dels anys s'han descobert molts STRs diferents localitzats en els diferents cromosomes, tant autosòmics com sexuals. Aquestes regions del DNA tenen una taxa de mutació alta pel què tendeixen a ser úniques per cada individu. En total s'utilitzen 15 STRs més el gen de l'amilogenina (que determina el sexe) per obtenir un perfil genètic consistent i amb un poder discriminatori, en moltes ocasions, el suficientment alt com per ser usat com a prova judicial. (Norrgard, 2014)

En un principi quan es troba una mostra de sang, no s'hauria de contaminar amb cap reactiu, però a vegades no es pot evitar, ja que no es veu a simple vista i s'ha de detectar. Per tant un bon reactiu de detecció hauria de ser sensible, específic, ràpid, simple, segur i que alteri el mínim possible la mostra (Tobe, Watson, & Nic Daeïd, 2007). Existeixen diferents tècniques de detecció de restes de sang latent però les més comunes són aquelles que utilitzen reactius que es basen en l'emissió de llum quan aquests entren en contacte amb el possible indici. Aquests reben molts de noms segons l'empresa que els comercialitza, però molts estan basats amb la utilització de la mateixa molècula: el luminol.

1.2. La Fluoresceïna

La 3',6'-dihidroxispiro[2-benzofurà-3,9'-xantan]-1-ú, $C_{20}H_{12}O_5$ o fluoresceïna és un compost orgànic trobat en forma de pols cristal·lina de color roig que en medi alcalí emet llum verdosa. Aquesta molècula té diferents utilitats, però la que interessa es la seva capacitat de reaccionar amb l'hemoglobina (agent oxidant) en presència d' H_2O_2 .

Per veure la seva reacció primer s'ha d'excitar el compost amb una font de llum d'entre 425 i 485 nm i utilitzar unes ulleres amb filtre per llum groga-taronja. La seva toxicitat és molt baixa i per tant quasi bé no interacciona ni afecta el DNA. [(Andersson, 2017), (National Center for Biotechnology Information, 2021)]

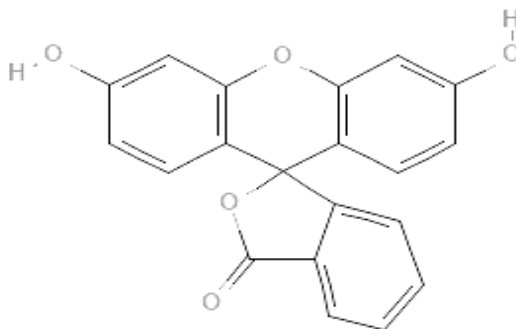


Figura 1: Molècula de la fluoresceïna. Extreta de (National Center for Biotechnology Information, 2021)

1.3. El luminol

La 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione o luminol, de fórmula $C_8H_7N_3O_2$, és una acil-hidrazina cíclica insoluble en aigua i que es troba en forma de pols cristal·lina d'un color groc pàl·lid. La seva característica principal és la seva capacitat d'emetre llum d'un color blavós en forma de quimioluminescència, que es produeix quan la molècula és oxidada entre un peròxid i un catalitzador (enzimàtic o mineral/metàl·lic) en medi bàsic. [(Cheyne, 2011), (Stoica, et al., 2016)]

La reacció per la qual el luminol emet llum és un procés complex que depèn de diferents passos i de molts factors com el pH, la temperatura, la força iònica del medi i els reactius presents en la solució. Aquesta comença quan es dissol el luminol en un medi alcalí, NaOH per exemple, el que fa que perdi un o els dos hidrògens (H) que hi ha enllaçats amb els nitrogen (N) de l'anell, seguidament la càrrega negativa es reparteix entre els grups carbonil del costat amb la conseqüent formació d'una espècie que queda en un estat de ressonància. Aquests àtoms de N tendeixen a enllaçar-se entre ells i marxar de la molècula ja que la generació de N_2 gas està afavorida entròpicament, per això quan el donador d'oxigen, com el H_2O_2 , entra en contacte amb un catalitzador (l'hemoglobina amb la seva activitat pseudo-peroxidasa o el ferro que conté) aquest catalitza la

descomposició del peròxid en H_2O i O_2 i l' O_2 format substitueix els N i expulsa N_2 (gas). Aquesta substitució genera el 3-aminophthalat (3-APA) una espècie carregada energèticament ja que els electrons dels orbitals exteriors dels oxígens pugen a nivells superiors, que ràpidament retornen al seu estat no excitat alliberant l'energia en forma de quimioluminescència (figura 2). [(Stoica, et al., 2016), (Barni, Lewis, Berti, Miskelly, & Lago, 2007)]

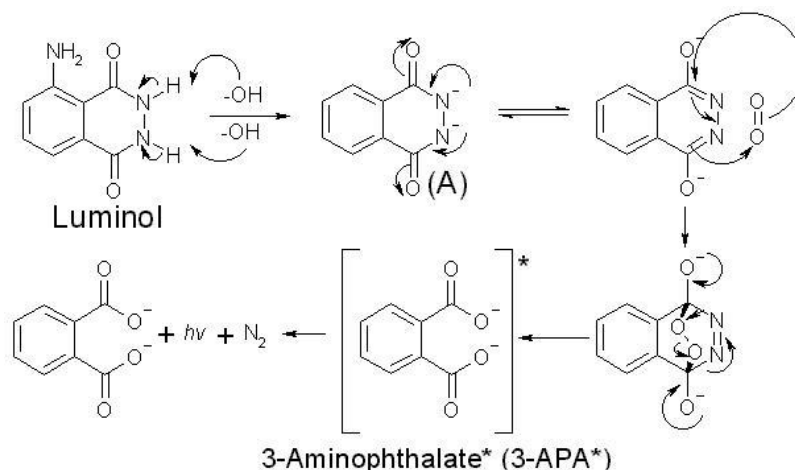


Figura 2: Mecanisme de la reacció d'emissió de llum del luminol. Extret de (Fleming, 2002)

Els reactius basats amb el luminol utilitzen el mateix principi, explicat anteriorment, però el què els diferencia els uns dels altres són els reactius i les concentracions amb les quals es mesclen que faran que les característiques de la quimioluminescència (intensitat i durada) i la interacció amb l'ADN siguin diferents.

La principal limitació d'aquests reactius és que s'han d'utilitzar amb la major obscuritat possible ja que sinó és impossible visualitzar l'emissió de llum, per tant, quan s'ha d'investigar una escena del crim en un habitatge, s'han de tancar llums, portes, persianes per limitar el màxim possible l'entrada de llum de fora en el cas que sigui de dia. Quan l'escena és a l'exterior però, s'haurà d'instal·lar tendes o inclús tornar quan la llum del sol no sigui un problema, endarrerint així la investigació i contribuint a que es pugui perdre informació. (Barni, Lewis, Berti, Miskelly, & Lago, 2007)

1.3.1. Bluestar (BS)

El reactiu Bluestar® Forensic és una fórmula patentada pel Professor Loïc Blum i l'equip d'investigació del Laboratori d'Enginyeria Biomolecular i Enzimàtic del Centre Nacional Francès per a la Recerca Científica (CNRS) de la Universitat Claude Bernard de Lion UCBL,

França. Els investigadors afirmen que aquesta formula és totalment compatible amb el DNA, estable, fàcil d'utilitzar i que produeix una quimioluminescència molt brillant i duradora en el temps. És extremadament sensible i pot detectar la sang en qualsevol superfície material, animal o vegetal, tan sòlida com líquida. També pot ser detectada tan pura com diluïda, fresca o antiga, seca o deteriorada. Els fabricants diuen que no és necessari un ambient de fosc total i no és necessària la utilització d'un equip fotogràfic especial per documentar l'evidència. [(Bluestar Forensics, 2021), (Andersson, 2017)]

1.3.2. Lumiscene (LCS)

El Lumiscene® és un nou reactiu de base aquosa que combina el luminol amb la fluoresceïna juntament amb una baixa concentració de H_2O_2 per minimitzar el dany del DNA de les restes de sang latent. El fabricant afirma que aquesta combinació presenta diferents avantatges sobre la resta de reactius com que el seu pic d'emissió es troba al voltant de 525 nm per tant emet una llum verdosa que és més susceptible a ser captada per l'ull humà, a més d'augmentar la intensitat de la llum emesa. El Lumiscene, igual que la resta de reactius, és aplicat en la màxima obscuritat possible. Quan no és possible, es pot utilitzar una llum forense (entre 425 i 480 nm) i unes ulleres amb filtre grog-taronja ja que les gotes seques es veuran de manera fosforescent. [(Loci Forenciscs B.V., 2000-2021), (Andersson, 2017)]

1.3.3. LumiUCIO (LUO)

El reactiu LumiUCIO és una nova fórmula basada amb el luminol, de producció pròpia de la Unitat Central d'Inspeccions Oculars (UCIO) de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra. La seva fórmula és confidencial i és la que es compararà enfront els altres dos reactius. En les primeres proves realitzades pels propis mossos en els seus laboratoris van observar que la intensitat amb la que emetia el reactiu en ser ruixat sobre una mostra de sang era més potent que la de la resta de reactius. Si la llum emesa és més potent es podrien trobar taques de sang més petites i, per tant, detectar més fàcilment restes de sang latent. Encara que sembla que tingui una avantatja clara amb la intensitat de la seva quimioluminescència es desconeixen els seus efectes sobre el DNA.

2. Objectiu

En aquest treball no s'ha plantejat una hipòtesi, sinó que l'objectiu principal és caracteritzar el comportament del LumiUCIO, un reactiu amb una nova fórmula per a la detecció de restes de sang latent, i comparar les seves propietats enfront de dos reactius comercials, el Bluestar® Forensic i el Lumiscene®. La comparació es durà a terme de forma aplicada mitjançant l'estudi de 4 de les característiques imprescindibles per un bon reactiu d'aquest tipus: la intensitat de l'emissió quimioluminescent, la durada d'aquesta i la quantitat i la qualitat del DNA recuperat de les mostres de sang. Per fer-ho s'ha dividit el treball en tres estudis:

- Estudi 1: Mesurar la intensitat de la quimioluminescència emesa pels diferents reactius i la durada d'aquesta.
- Estudi 2: Avaluar de forma quantitativa i qualitativa la possible degradació del DNA en mostres de sang de diferent antiguitat quan són ruixades amb els reactius.
- Estudi 3: Avaluar de forma quantitativa i qualitativa la possible degradació del DNA de les mostres de sang segons el temps que tarden a ser processades després d'haver estat ruixades amb el reactiu.

3. Metodologia

3.1. Preparació dels reactius

Els dos reactius comercials (Bluestar®Forensic i el Lumiscene®) es van preparar seguint les instruccions del fabricant. El reactiu LumiUCIO s'ha preparat segons les indicacions proporcionades pels mossos de la UCIO. Els tres reactius es van utilitzar immediatament després d'haver estat preparats i a temperatura ambient. [(Loci Forenciscs B.V., 2000-2021), (Bluestar Forensics, 2021)]

3.2. Disseny experimental

La sang utilitzada va ser proporcionada per un voluntari baró, sa. La sang es va obtenir per punció intravenosa, es va recollir en tubs amb EDTA com anticoagulant i conservada

a 4°C fins la seva utilització. Les mostres es van preparar en les dues primeres hores posteriors a l'extracció de la sang.

Els reactius necessaris per a la realització del treball van ser donats pels mossos de la UCIO de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra, de la mateixa manera que les caixetes de cartró necessàries per guardar les mostres un cop recollides. Es va intentar, dins les condicions de laboratori existents, que el procés de ruixat i emmagatzematge de les mostres s'assemblés el màxim possible al dut a terme per la pròpia UCIO.

3.2.1. Estudi 1: Intensitat i durada de la quimioluminescència

Per analitzar la intensitat i la durada de l'emissió de quimioluminescència es va utilitzar un espectrofotòmetre acoblat a una fibra òptica situat en el laboratori cedit pel Dr. Josep Maria Serres. Es van realitzar 3 dilucions diferents de la sang intravenosa: 1/10, 1/1000 i 1/100000. La reacció es va dur a terme en tubs de vidre de 15 mL mesclant 0,5 mL de dilució amb 1 mL de reactiu. Es va mesura l'emissió de llum durant un minut i mig.

Les dades extretes de les diferents mesures es van analitzar amb el programa Matlab fent servir el codi 1 de l'Annex 8.1.

3.2.2. Estudi 2: Degradació del DNA en mostres de diferent antiguitat

En l'estudi 2 i 3 només es van comparar el LumiUCIO vers el Lumiscene, que és el que utilitza actualment la UCIO de la Policia Científica del Cos de Mossos d'Esquadra.

En dues superfícies diferents, una porosa (paper) i una no porosa (plàstic) es van generar gotes de 100 µL de sang directament del tub EDTA i es van guardar a temperatura ambient fora de l'abast de la llum del sol. Aquestes gotes es van ruixar amb un polvoritzador a 1, 15, 30, 45 i 60 dies després d'haver-se dipositat en el suport amb el reactiu corresponent (Lumiscene o LumiUCIO) o amb aigua en la mostra control. Es van realitzar dos ruixats a 25 cm de distància de les gotes. Després es va recollir la mostra amb un hisop i es va deixar assecar. Un cop seques es van guardar en caixetes de cartró i a la nevera a 4 °C. Les gotes de sang dipositades en el paper es van ruixar de la mateixa manera que en les del plàstic, però després de deixar-les assecar es van guardar en tubs eppendorfs a la nevera a 4 °C. L'extracció del DNA es va realitzar 24h després del ruixat

i d'haver-se recollit, ja que en condicions reals no es sempre possible processar les mostres el mateix dia que són recollides.

3.2.3. Estudi 3: Degradació del DNA en mostres de sang exposades al reactiu durant diferents temps

En una superfície no porosa diferent a la del estudi 2 (vidre) es van dipositar gotes de sang de 40 µL* directament del tub EDTA i es va realitzar una extensió de sang. Es van deixar assecar 24h i es van ruixar amb un polvoritzador a 25 cm de distància i dues vegades amb el reactiu corresponent (Lumiscene o LumiUCIO) o amb aigua (control). Les mostres es van recollir amb un hisop, es van deixar assecar i es van guardar en caixetes de cartró a la nevera a 4 °C. L'extracció del DNA es va realitzar a 1, 3 o 7 dies després d'haver-se ruixat.

*El volums de les gotes de sang dels estudis 2 i 3 són diferents perquè en el vidre les gotes de 100 µL no van donar resultats coherents i es va decidir repetir-ho amb menys quantitat i estenent la sang.

3.3. Extracció i quantificació del DNA i PCR de STRs

L'extracció del DNA es va realitzar seguint els passos de l'apartat 4.B. del kit DNA IQ™ System – Small Sample Casework Protocol amb la modificació que en les mostres d'hisop es van utilitzar 350 µL de Lysis Buffer en comptes de 250. (Promega Corporation, 2013)

Un cop realitzada l'extracció es va comprovar la presència de DNA quantificant-lo, realitzant una PCR quantitativa a temps real (qPCR) seguint el protocol del kit Quantifiler® Human Kits de life technologies™. (Life Technologies Corporation, 2014)

Abans de la qPCR es va realitzar la quantificació del DNA extret mitjançant el NanoDrop 1000 Spectrophotometer de Thermo Scientific i confirmant els resultats amb un gel d'electroforesi d'agarosa al 0,8 % i tampó TBE al 0,5 %. Degut a la inconsistència dels resultats obtinguts i la poca sensibilitat del Nanodrop, de mínim 2 ng/µL, es va decidir utilitzar la qPCR com a mètode més sensible.

La possible degradació del DNA es va comprovar utilitzant una aproximació publicada per Tobe et al. (Tobe, Watson, & Nic Daeïd, 2007). Aquesta consisteix en amplificar els STRs D19S433 (D19) i el D2S1338 (D2), el més petit i el més llarg respectivament en els

kits utilitzats per obtenir un perfil genètic complet. En aquest article però, s'intercanvien els rols i el D2 dona un fragment més petit al voltant de 170 pb i el D19 al voltant de 200 pb. Després es van observar amb un gel d'agarosa del 3 % i un tampó TBE al 0,5 %. La presència de producte d'amplificació en el gel per part dels dos STRs, només d'un o de cap, indica de forma qualitativa el nivell de degradació del DNA.

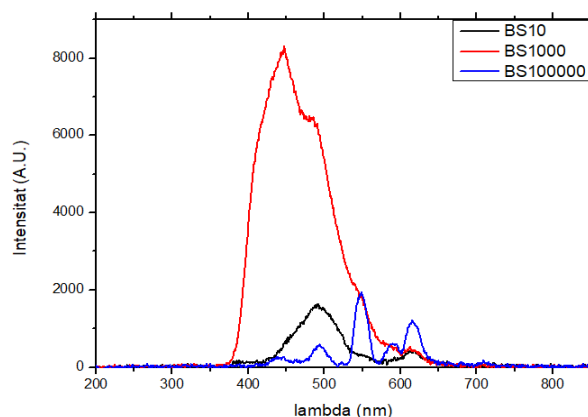
Les PCR dels sets de *primers* de cada STR es van realitzar en pous separats en un volum total de 20 µL. Les concentracions finals dels *primers* van ser d'1 mM per cadascun i la de DNA de 2 ng totals (per a les mostres que no tenien 2 ng es va utilitzar el volum necessari per arribar a 20 µL després d'haver afegit la màster mix). Es va realitzar una primera pre-desnaturalització de 3 min a 95 °C seguida de 37 cicles de 30 s a 95 °C; 30 s a 57 °C i 59 °C per al set de *primers* D19 i D2 respectivament; 60 s a 72 °C i una extensió final de 10 min a 72 °C. Es va utilitzar el kit Thermo Scientific DreamTaq afegint formamida al 1 % i el termociclador 2720 Thermal Cycler d'Applied Biosystems (Thermo Fischer Scientific Inc., 2016))

Un cop realitzades les electroforesis es van prendre imatges dels gels amb un transil·luminador i van ser analitzades amb el programa ImageJ. Com a referència/patró es va utilitzar la banda de 200 pb del marcador de pes molecular. (Ferreira & Rasband, 2012)

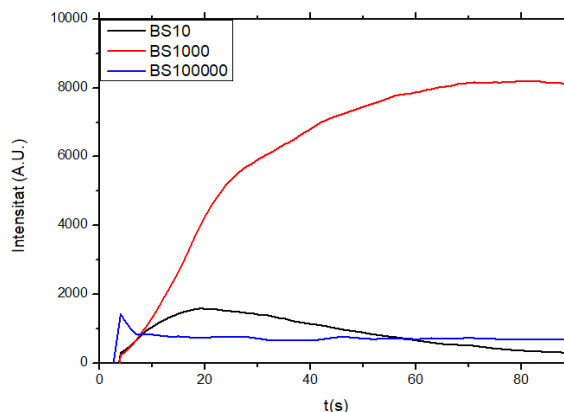
4. Resultats i Discussions

4.1. Estudi 1: Intensitat i durada de la quimioluminescència

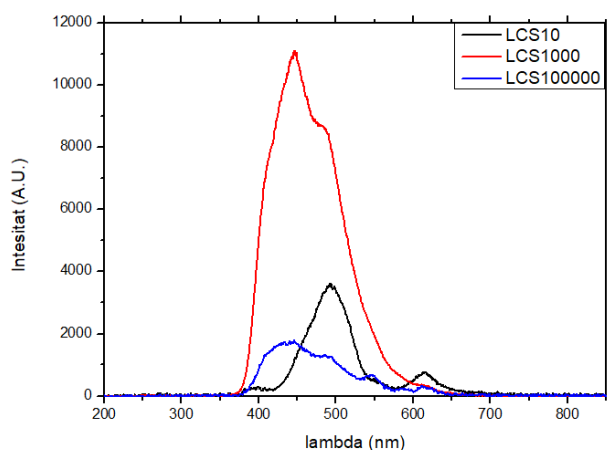
Un cop realitzades totes les mesures i els gràfics, es va observar que tots tres reactius van donar quimioluminescència amb major o menor intensitat. A continuació tenim els gràfics de la intensitat respecte la longitud d'ona en el costat esquerre i la intensitat respecte el temps a la dreta de la pàgina, de les 3 dilucions dels 3 reactius i una comparació entre ells.



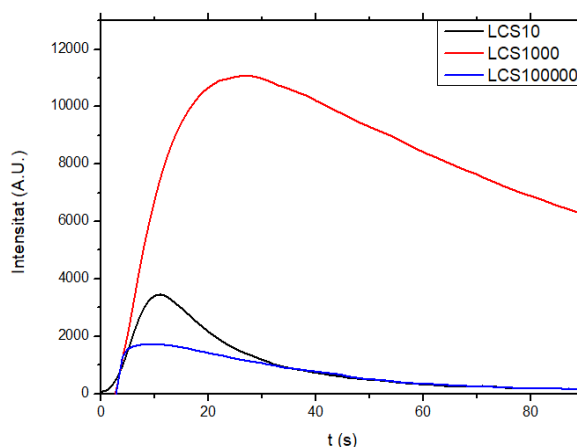
Gràfica 1: Representació de la intensitat vs la longitud d'ona de les 3 dilucions 1/10, 1/1000 i 1/100000 del reactiu Bluestar (BS).



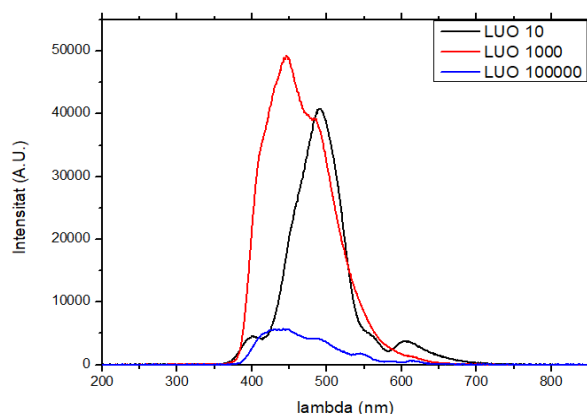
Gràfica 2: Representació de la intensitat vs el temps de les 3 dilucions 1/10, 1/1000 i 1/100000 del reactiu Bluestar (BS).



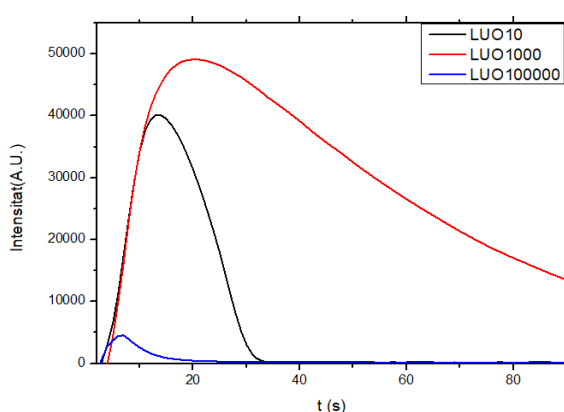
Gràfica 3: Representació de la intensitat vs la longitud d'ona de les 3 dilucions 1/10, 1/1000 i 1/100000 del reactiu Lumiscene (LCS).



Gràfica 4: Representació de la intensitat vs el temps de les 3 dilucions 1/10, 1/1000 i 1/100000 del reactiu Lumiscene (LCS).



Gràfica 5: Representació de la intensitat vs la longitud d'ona de les 3 dilucions 1/10, 1/1000 i 1/100000 del reactiu LumiUCIO (LUO).



Gràfica 6: Representació de la intensitat vs el temps de les 3 dilucions 1/10, 1/1000 i 1/100000 del reactiu LumiUCIO (LUO).

Els resultats obtinguts en aquest experiment són que en tots tres reactius veiem on la dilució que dona una intensitat major i més sostinguda en el temps és la 1/1000, seguida de la 1/10 i, per últim, la 1/100000.

Això és degut a que en la dilució 1/10 la sang es troba més concentrada i, per tant, la solució és més espessa, fet que no propicia una bona homogeneïtzació en el moment d'afegir els reactius i, en conseqüència, les molècules de luminol, H_2O_2 i catalitzador no reaccionen adequadament. En la dilució 1/100000 tenim una concentració molt baixa de sang i, per tant, de catalitzador, per això encara que afegim un excés de reactiu no hi ha la suficient formació d' O_2 per a què reaccioni amb el luminol. Així doncs, en aquest experiment la dilució 1/1000 és la que combina la millor concentració de catalitzador amb la de reactiu i, per tant, tenim el major número d'interaccions que acaben amb la generació de més llum respecte la resta.

En les gràfiques també es pot observar que en la dilució 1/10 per als tres reactius la intensitat màxima la trobem al voltant de 500 nm i, en canvi, en la de 1/1000 i 1/100000 la trobem al voltant de 450 nm, a excepció de la 1/100000 del Bluestar que emet al voltant de 550 nm. Els resultats per el Lumiscene difereixen de l'afirmat pel fabricant ja que el seu pic d'emissió s'hauria de situar al voltant de 525 nm i haver emès una llum verdosa, però aquest no ha estat el cas, donant el pic al voltant de 400-450 nm i una llum blavosa com els altres dos reactius. Això és degut a que la llum que veiem és la procedent del luminol, i no la de la fluoresceïna la qual emet en la longitud d'ona de 525 nm quan és excitada com s'ha explicat anteriorment amb una llum de 425-480 nm.

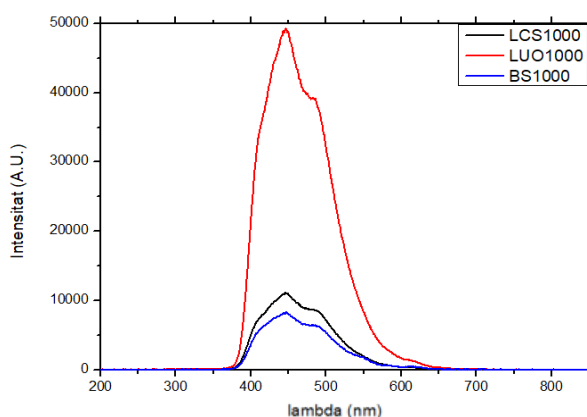
4.1.1. Comparació dels 3 reactius en la concentració de sang 1/1000

El que observem en els gràfics 7 i 8 és que el LumiUCIO és el reactiu que dona una intensitat més elevada al voltant de 4,6 i 6 vegades superior a la del Lumiscene i la del Bluestar respectivament. El Lumiscene dona una intensitat 1,4 vegades superior a la del Bluestar. Mantenint constant el volum i la concentració de la sang i afegint sempre el mateix volum de reactiu, el que dona aquesta diferència en les intensitats és la concentració de luminol i H_2O_2 . Aquests dos compostos són els únics responsables de la

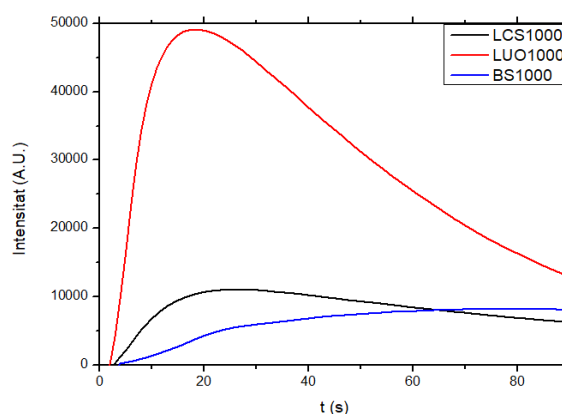
quimioluminescència per part del reactiu, ja que el ferro i l'activitat pseudo-peroxidasa de l'hemoglobina, com ja s'ha dit, són els catalitzadors proporcionats per la sang.

La concentració de luminol dels reactius comercials és desconeguda, per tant, només basant-nos en la concentració d' H_2O_2 , el Bluestar seria el que més en té (3 %) però el que dona menor intensitat, seguit del LumiUCIO que és el segon (confidencial) i és el que presenta una major intensitat lumínica. Per últim, tenim el Lumiscene amb menys d'un 0,12 % de concentració d' H_2O_2 , però el segon en el rànquing d'intensitats.

Aquests resultats poden ser deguts, igual que amb les diferents concentracions de sang, a que el millor resultat el doni aquell amb el balanç de reactius òptim. Encara que aquesta afirmació no es pot assegurar, ja que no es coneix quina és la relació exacta entre les concentracions de luminol (més la fluoresceïna en el cas del Lumiscene) i H_2O_2 . (Blum, Esperança, & Rocquefelte, 2006)



Gràfica 7: Representació de la intensitat vs la longitud d'ona de la dilució de 1/1000 dels tres reactius. BS=Bluestar; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO



Gràfica 8: Representació de la intensitat vs el temps de la dilució de 1/1000 dels tres reactius. BS=Bluestar; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO

Cal remarcar que aquest experiment s'ha realitzat amb mostres de sang líquides i, per tant, és necessària la realització d'estudis posteriors amb restes de sang latents sòlides. Cal afegir que les unitats de la intensitat (unitats arbitràries o A.U.) dependran de les característiques de la fibra òptica utilitzada i de la distància entre el tub de la reacció i la fibra. Per tant, si es vol repetir l'experiment s'han de comparar els resultats obtinguts entre mostres del mateix estudi. Les condicions entre diferents estudis no es poden repetir amb exactitud, doncs una petita variació en la distància entre la fibra i el tub i/o la inclinació de la incidència de la llum faria que els resultats variessin d'un grup de mesures a l'altra.

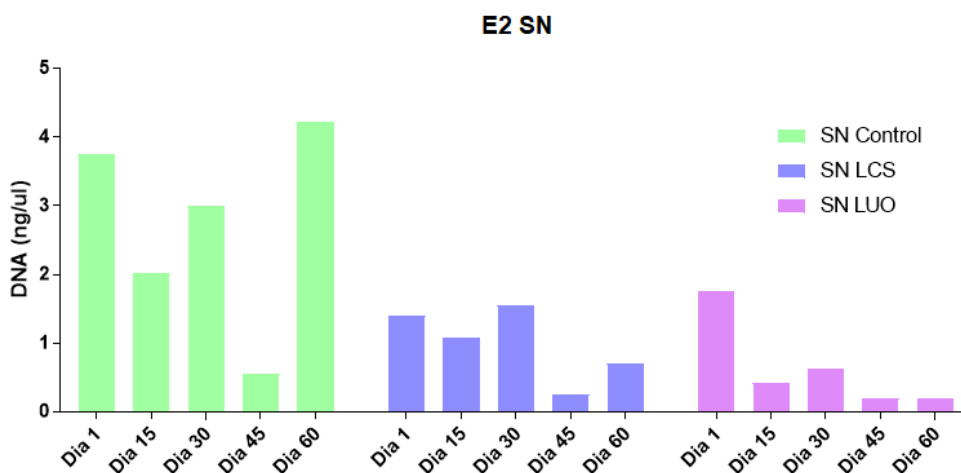
4.2. Estudi 2: Degradació del DNA en mostres antigues

4.2.1. Quantificació de DNA

Un cop realitzada la PCR quantitativa de les mostres recollides en els diferents dies es va trobar que en totes les mostres de les dues superfícies hi havia presència de DNA en major o menor quantitat.

4.2.1.1. Superfície no porosa (SN)

En les mostres dipositades en la superfície no porosa (plàstic) observem que les que donen major concentració de DNA extret en general són les control, seguides per les de LCS i, per últim, les de LUO. El grup control manté de forma més o menys estable el DNA extret al voltant de 2 ng/ μ L de mitja, a més, la seva R^2 en fer una regressió lineal és propera a 0, el que significaria que la quantitat de DNA extret no es veuria afectada amb el pas del temps en l'interval mesurat (Annex 8.2 Taula sup. 1). El LCS sosté la quantitat de DNA extret al voltant de 1,3 ng/ μ L fins el dia 30 i es redueix al voltant de la meitat en arribar al dia 60. En canvi, en el LUO s'observa que des del dia 1 fins el 15 es redueix la quantitat extreta, que es sosté fins el dia 30, després baixa fins els 0,2 ng/ μ L i es manté del dia 45 fins el 60. La seva R^2 és de 0,6658 amb una pendent negativa, el que significa que la quantitat de DNA extret disminueix amb el pas del temps en l'interval mesurat (Annex 8.2 Taula sup. 1 i Gràfica 9)

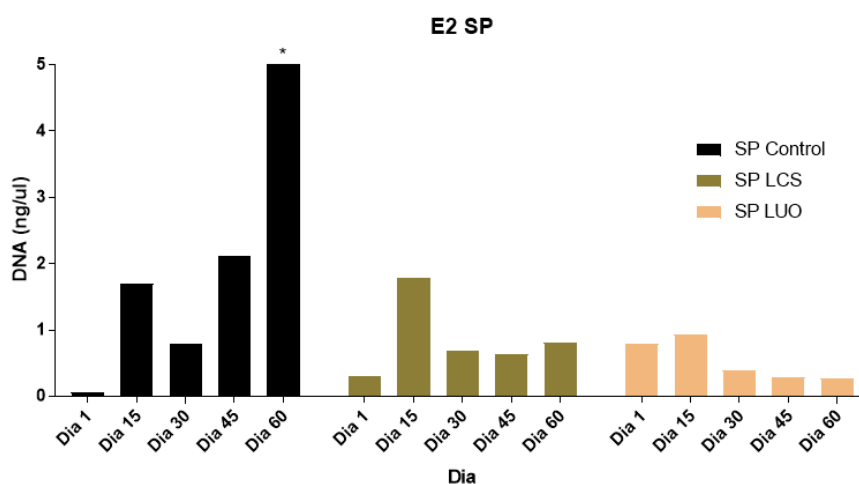


Gràfica 9: Representació de les dades de la Taula sup. 1 (Annex 8.2). SN=Superfície no porosa; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO

En el moment de recollir les mostres amb l'hisop es va veure que les gotes de 100 µL dipositades es van cristal·litzar i la seva recuperació completa va ser impossible degut a la saturació del cotó de l'hisop.

4.2.1.2. Superfície porosa (SP)

En les control s'observa que entre els 15 i els 45 dies s'extreu al voltant de 1,5 ng/µL. El resultat dels dies 1 i 60 no concorden massa amb la tendència de les mesures del mig, per tant, no les tindrem en compte i queda una R^2 de 0,0946. El LCS manté la quantitat de DNA extreta des del dia 30 fins el 60 al voltant de 0,65 ng/µL i en fer la R^2 aquesta surt al voltant de 0 (Annex 8.2 Taula sup. 1). El LUO manté del dia 1 fins al 15 el DNA extret al voltant de 0,85 ng/µL, es redueix a la meitat en el dia 30 i baixa lentament fins el dia 60 amb una R^2 de 0,757 amb pendent negativa. (Gràfica 10)



Gràfica 10: Representació de les dades de la taula 2 (Annex 8.2). *Valor fora del gràfic.
SP=Superfície porosa; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO

Les limitacions d'aquest apartat es van donar en el moment de l'extracció, on la contaminació deguda al paper era bastant gran. Això fa pensar que va interferir en el pas de la captació del DNA per part de la resina, ja que amb els rentats no es va aconseguir eliminar tota la matriu sòlida en moltes de les mostres i aquestes quedaven turbulentes. A més, el kit per a l'extracció utilitzat és per a un màxim de 40 µL de sang, per tant, també hi ha hagut una saturació de la resina que hauria suposat una pèrdua DNA. (Promega Corporation, 2013)

Degut a la inconsistència dels resultats quan es van mesurar al Nanodrop i la poca quantitat de mostra restant, es va decidir que en la qPCR es realitzaria un *pool* de les

rèpliques. Per tant, no es va poder realitzar un anàlisi estadístic per comparar si hi ha una diferència significativa entre els diferents reactius i entre si la mostra es ruixada abans o després mitjançant un test ANOVA d'un sentit. Aquest primer disseny experimental ens ha permès obtenir les condicions òptimes per a treballar amb aquest tipus de mostres i una primera caracterització aproximada de les característiques del LumiUCIO.

4.2.2. Qualitat del DNA

4.2.2.1. Superfície no porosa (SN)

En observar els gels d'electroforesi sota la llum del transil·luminador, en el cas del D19 (Figura 3), obtenim producte d'amplificació en els dies de l'1 al 30 però no en el 45 i 60 tan per el grup control com pel LCS. En el reactiu LUO apareixen bandes del dia 1 al 45 però no s'observa res en el dia 60. En els carrils que hi ha producte aquest s'observa al voltant de l'altura de 200 pb, segons la bibliografia utilitzada. (Tobe, Watson, & Nic Daeïd, 2007)

Pel que fa al gel d'electroforesi resultant de l'amplificació del STR D2 (Figura 4), segons l'article d'on es van extreure els *primers* (Tobe, Watson, & Nic Daeïd, 2007) aquest surt al voltant de 170-180 pb, per tant, aquesta altura en el gel correspon a la banda marcada amb una fletxa en la Figura 4, que es troba per sota de la banda de 200 pb. En el grup control s'obtenen bandes del dia 1 fins al 30 i no s'observa res en la resta de dies, en els reactius LCS i LUO observem que hi ha amplicó en tots els dies, però les bandes dels dies 45 i 60 son menys intenses que la resta.

El control negatiu del C-19 no dona cap amplicó, però el del D2 dona una sèrie de bandes fluixes, aquestes son degut a una contaminació en el moment de carregar el gel, ja que si els *primers*, l'aigua i/o la màster mix haguessin estat contaminats en els controls de 45 i 60 dies haurien donat el mateix patró de bandes. A més a més, en PCRs posteriors es va comprovar la puresa dels reactius utilitats i no es va obtenir cap producte.

Els resultats observats en els gels s'ha confirmat amb un anàlisi mitjançant el programa ImageJ que permet mesurar la intensitat relativa de les bandes respecte el fons. S'ha agafat com a patró el marcador de pes molecular (MW), exactament la banda de 200 pb, ja que sempre s'hi ha afegit la mateixa quantitat i es troba a una altura similar

a la dels amplicons, i se li ha donat el 100 % d'intensitat. El gràfics 10 i 11, situats sota les seves respectives figures, ens mostren de manera visual aquests percentatges relatius. Per sota del 10 % es considera que no hi ha hagut amplificació.

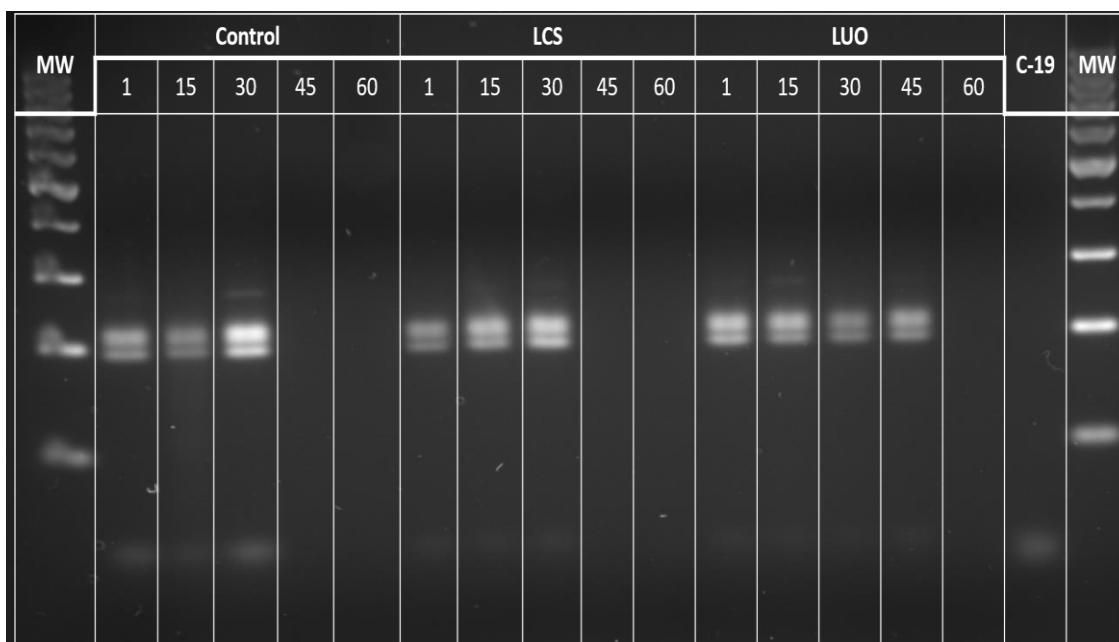
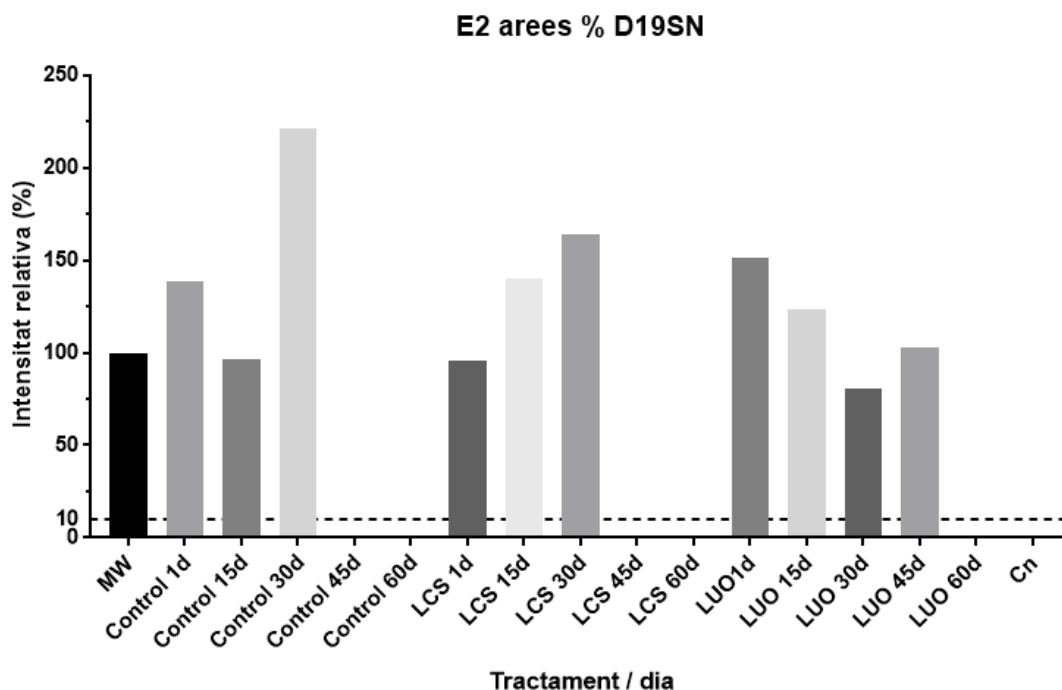


Figura 3: Gel d'electroforesi de la PCR d'amplificació dels primers per al STR D19S433 de les mostres de superfície no porosa. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; C-=control negatiu



Gràfica 10: Representació en gràfic de columnes dels percentatges de les àrees sota la corba de les mostres de la superfície no porosa i del STR D19S433 extrets a partir de la Taula 3 de l'Annex 8.2. SN=Superfície no porosa; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; Cn=control negatiu

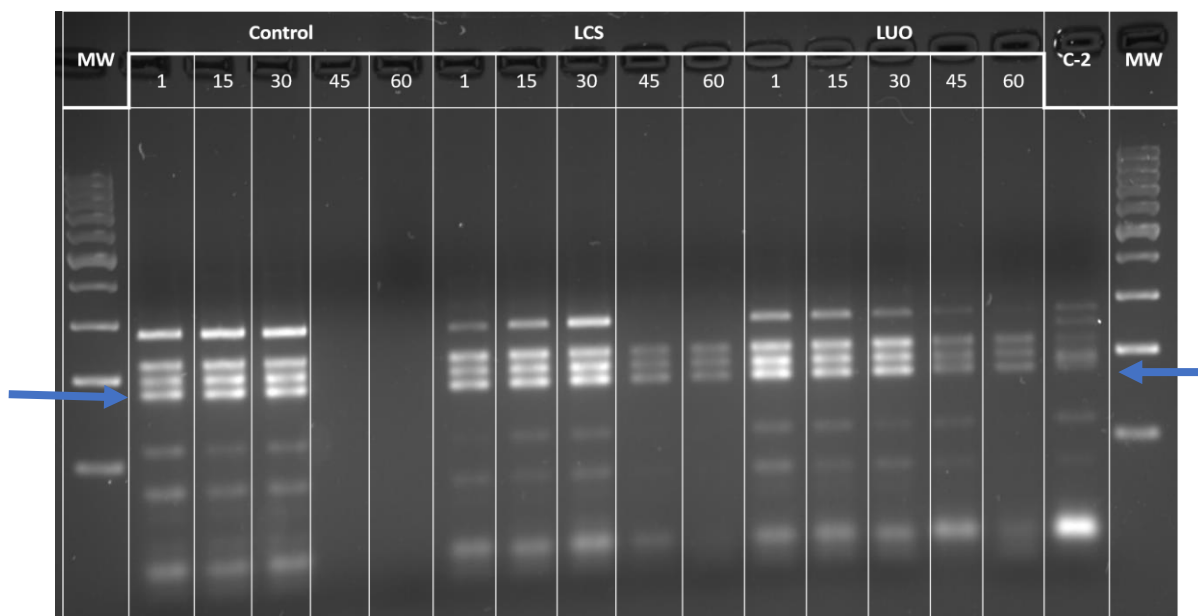
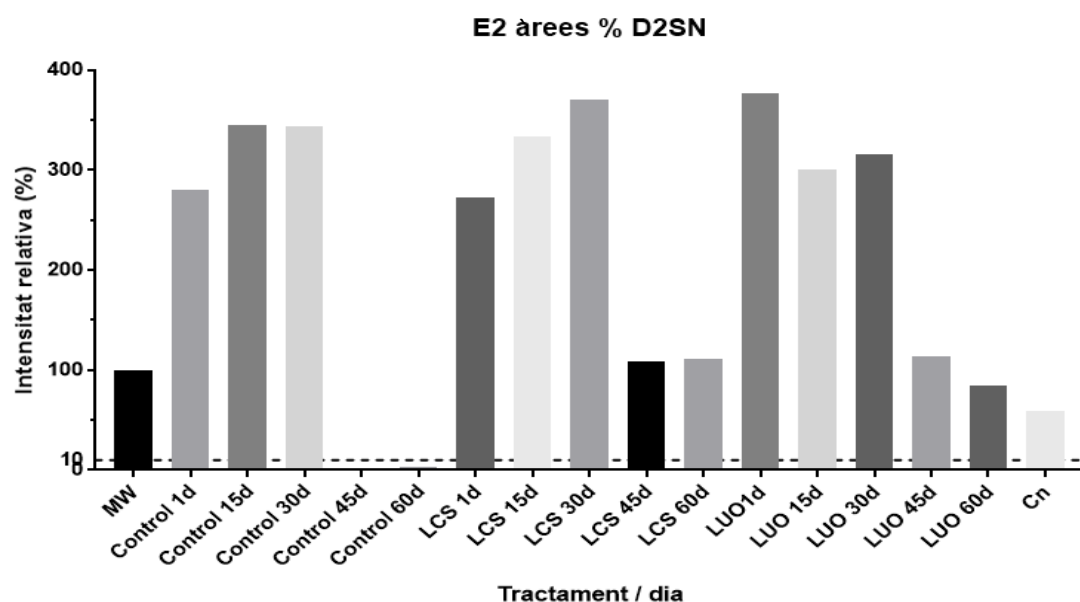


Figura 4: Gel d'electroforesi de la PCR d'amplificació dels primers per al STR D2S1338 de les mostres de superfície no porosa, altura de la banda senyalada amb fletxes blaves. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; C=control negatiu



Gràfica 11: Representació en gràfic de columnes dels percentatges de les àrees sota la corba de les mostres de la superfície no porosa i del STR D2S1338 estretes a partir de la Taula 3 de l'Annex 8.2. SN=Superfície no porosa; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; Cn=control negatiu

4.2.2.2. Superfície porosa (SP)

Pel què fa a les mostres de la superfície porosa, els resultats han estat poc concloents. Com podem observar en el gel del STR D19 (Figura 5) el grup control només presenta banda en el dia 1 i 30, el reactiu LCS en el dia 15 i 60 i el LUO en els dies 15, 45 i 60. En el gel del STR D2 (Figura 6) veiem que el grup control presenta bandes en els mateixos carrils que en el D19, en canvi, el LCS presenta bandes en tots els dies excepte el 45 i el LUO en tots. El motiu d'aquestes davallades entre dies consecutius és degut possiblement a, com s'ha dit anteriorment en l'apartat de quantificació del DNA, la impossibilitat d'eliminar completament la matriu de paper, que podria haver fet que la integritat del DNA quedés afectada i/o interferir en l'amplificació.

L'observat en les imatges es confirma amb les dades proporcionades pels gràfics 12 i 13, que representen la intensitat relativa de cada banda respecte la banda de pes molecular de 200 pb que s'ha considerat com el 100 %. Per determinar que no hi ha presència d'una banda degut a la PCR, s'ha establert que per sota de 10 % no es considera que hi ha hagut amplificació. Hi ha però, una excepció en el carril del control de 45 dies del gel D2 (Figura 6), que ha donat un valor de 12,2 % (Annex 8.2. Taula sup. 3). Això és degut a la brutícia i la coloració blanquinosa del propi gel que produeix aquesta pujada en la intensitat, que no es correspon amb la presència de bandes.

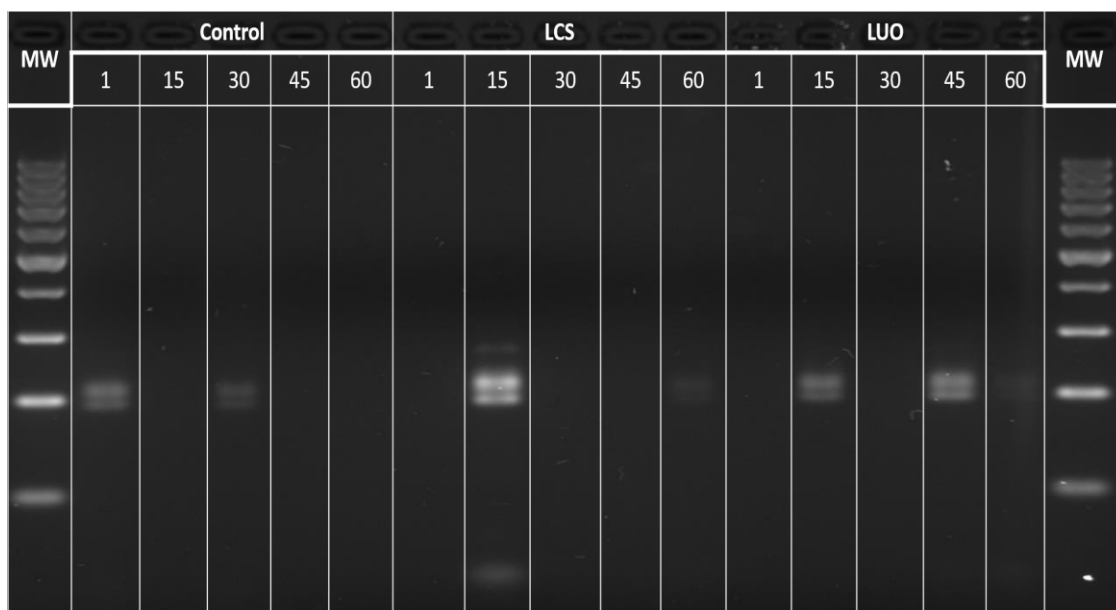
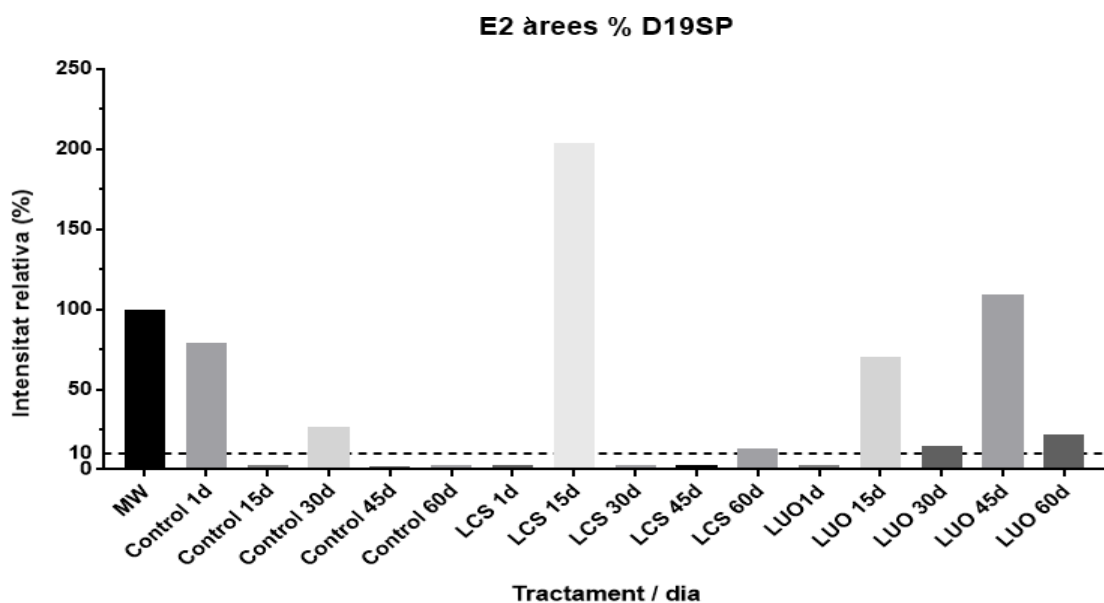


Figura 5: Gel d'electroforesi de la PCR d'amplificació dels primers per al STR D19S433 de les mostres de superfície porosa. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular;



Gràfica 12: Representació en gràfic de columnes dels percentatges de les àrees sota la corba de les mostres de la superfície porosa i del STR D19S433 extretes a partir de la Taula 3 de l'Annex 8.2.
SP=Superfície porosa; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; Cn=control

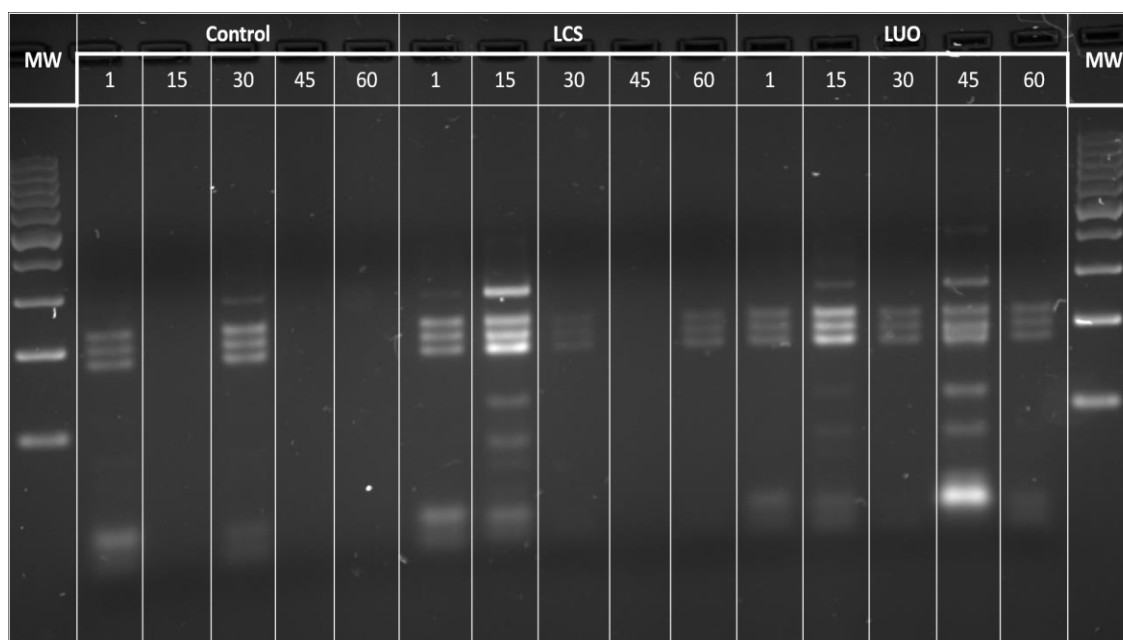
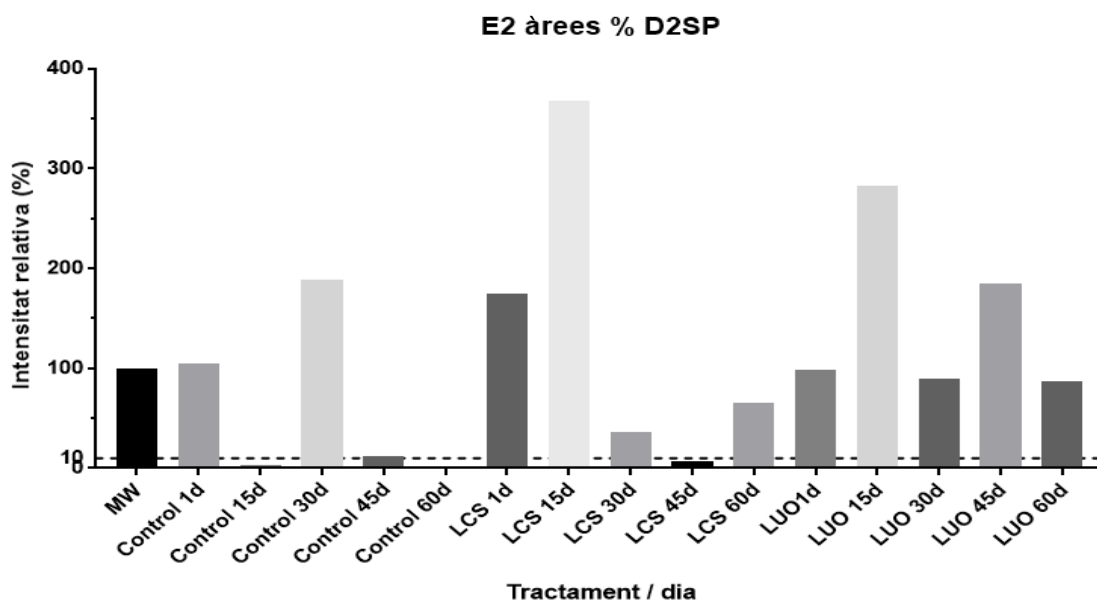


Figura 6: Gel d'electroforesi de la PCR d'amplificació dels primers per al STR D2S1338 de les mostres de superfície porosa. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular;



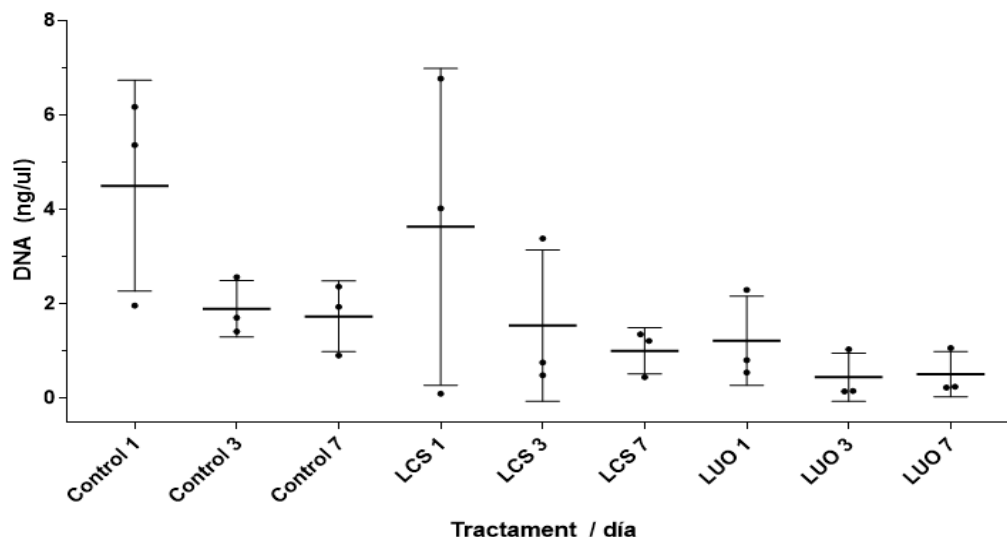
Gràfica 13: Representació en gràfic de columnes dels percentatges de les àrees sota la corba de les mostres de la superfície no porosa i del STR D2S1338 estretes a partir de la Taula 3 de l'Annex 8.2.
SP=Superfície porosa; LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; Cn=control

4.3. Estudi 3: Degradació del DNA en mostres macerades amb el reactiu

4.3.1. Quantificació de DNA

Pel que fa a les mostres de l'estudi 3 es va realitzar la qPCR dels triplicats de cada reactiu i dia, els resultats obtinguts s'observen en la Gràfica 14. Podem observar que el grup control és el que manté en general la major quantitat de DNA extreta al llarg del temps. El segueix el reactiu LCS i, per últim, el LUO. Si mirem però els valors de les rèpliques, veiem que el dia 1 dels tres grups tenen una desviació estàndard propera a 1 pel cas del LUO i superior a 2 i 3 per al control i LCS respectivament. És a dir, encara que el LUO doni uns valors més baixos, és el que ha donat uns valors més precisos respecte els altres dos grups.

Quan s'ha realitzat la valoració estadística a través d'un test ANOVA d'un sentit, en cap dels tres tractaments s'ha donat que la quantitat de DNA extreta en un dia o en un altre fos significativa. És a dir, no hi ha diferències de que processar la mostra en el dia 1 o en el dia 7 tingui rellevància estadística, ni tampoc la té la utilització d'un reactiu o d'un altre.



Gràfica 14: Representació en gràfic de les dades de la quantificació per qPCR de la Taula 4 de l'Annex 8.3.
LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO

4.3.2. Qualitat del DNA

En realitzar les electroforesis resultants de l'amplificació dels fragments dels STR D19 i D2, es van obtenir els resultats que es poden observar en les figures 7 i 8 respectivament.

En aquests gels degut a la falta d'espai, les diferents bandes no es van poder separar adequadament i per això, s'observa que a l'altura de 200 pb, que es on surt la banda del D19, només se n'observa una de més ampla, a diferència de les observades en els gels de l'estudi 2. Els resultats obtinguts mostren presència de bandes en tots els carrils, excepte en dos rèpliques del control de 3 dies i en les 3 del control de 7 dies. En la gràfica de sota (Gràfica 15) tenim els percentatges de la intensitat relativa de les bandes respecte la banda de marcador de pes molecular de 200 pb (s'ha realitzat una mitjana de les intensitats de totes les bandes de MW). Pel que fa a l'estudi 3 s'ha establert que per sota del 15 % es considera que no hi ha hagut amplificació i, per tant, no hi ha hagut amplificació. Es confirma doncs, l'absència de banda en els dos carrils del control del dia 3 i en els 3 del control del dia 7. Respecte la resta de tractaments i dies veiem que les seves mitjanes oscil·len més o menys pel voltant de 100 % i 150 %.

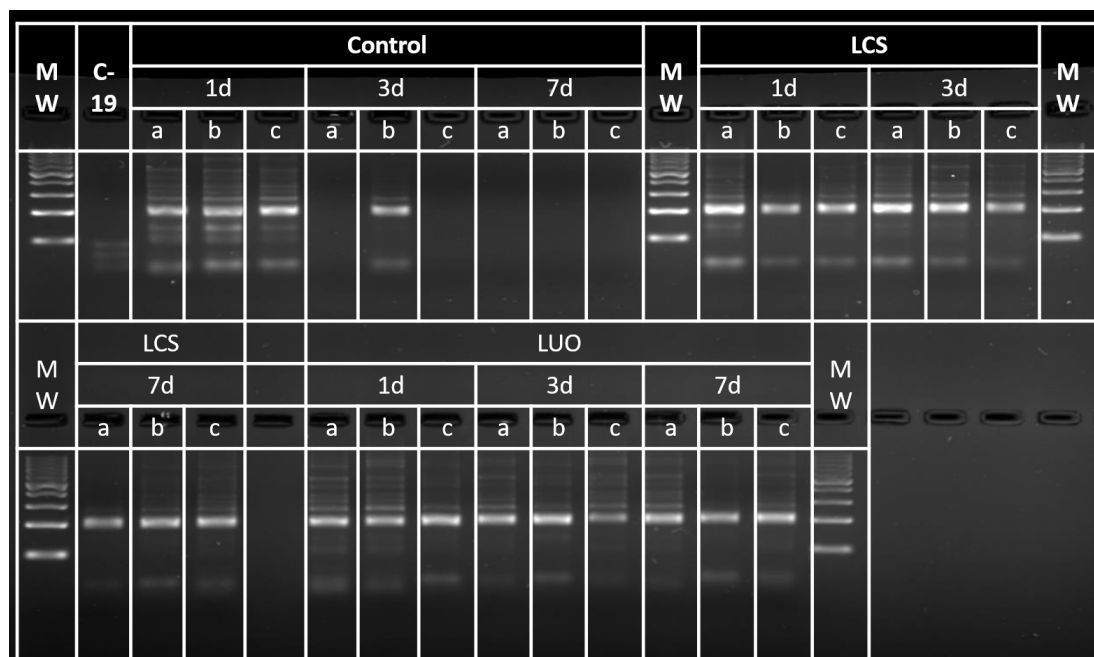
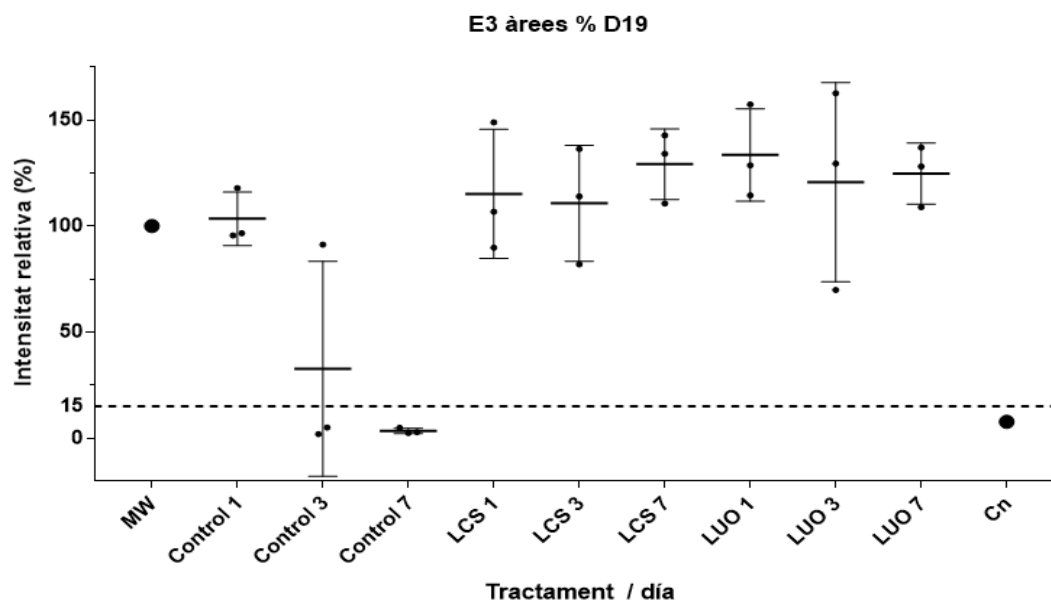


Figura 7: Gel d'electroforesi de la PCR d'amplificació dels primers per al STR D19S433 de les mostres de l'estudi 3. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; C-=control negatiu



Gràfica 15 : Representació en gràfic dels percentatges de les àrees sota la corba de les mostres de la superfície porosa i del STR D19S433 extretes a partir de la Taula 5 de l'Annex 8.3. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; Cn=control negatiu

Pel que fa al gel del STR D2 observem que la falta d'espai també ha provocat que les bandes no s'hagin separat correctament. Segons la mida esperada, la banda corresponent és la de sota del grup que es troba al voltant de 200 pb. Pel que fa a les bandes es repeteix el mateix patró que en el gel del D19, amb la diferència que una de les rèpliques del tractament LCS no mostra presència de banda.

En la Gràfica 16 observem que els carrils que no mostren banda tenen un valor per sota del 15 %. A diferència del gel anterior (Figura 7), s'observa que la intensitat de les rèpliques d'un mateix grup tenen intensitats més dispars. És curiós que sigui el gel del STR D2 el que doni més variació en les intensitats, ja que amb el set de *primers* utilitzats (Tobe, Watson, & Nic Daeïd, 2007) el D19 hauria de ser el que presentes més variació respecte el D2 perquè el D19 és el que dona un fragment més gran.

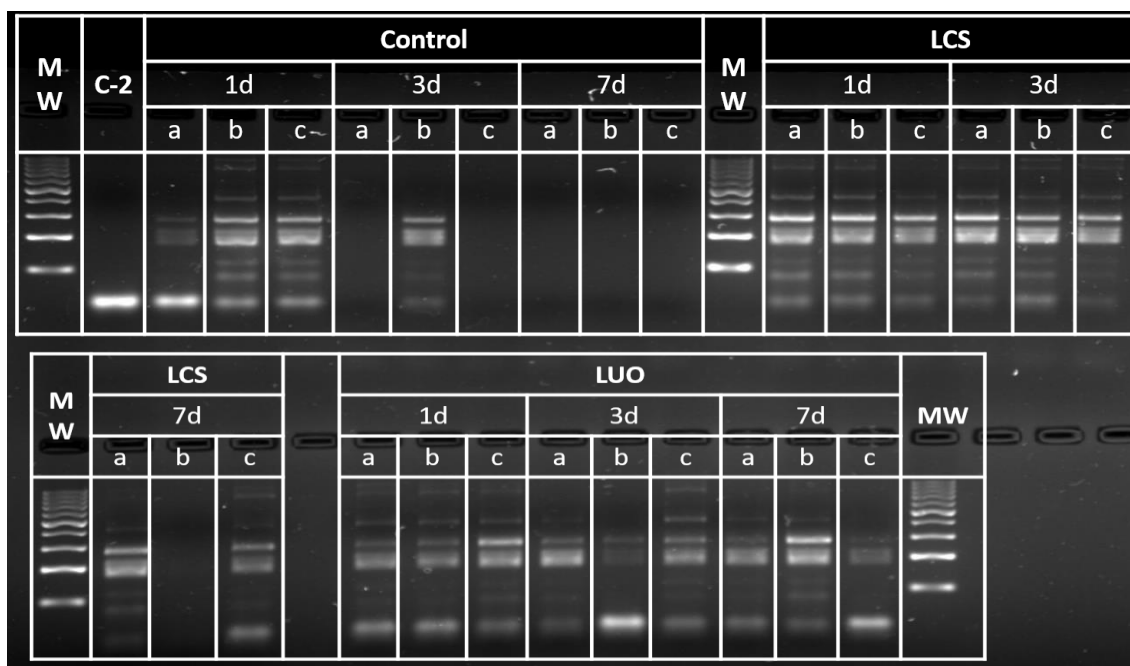
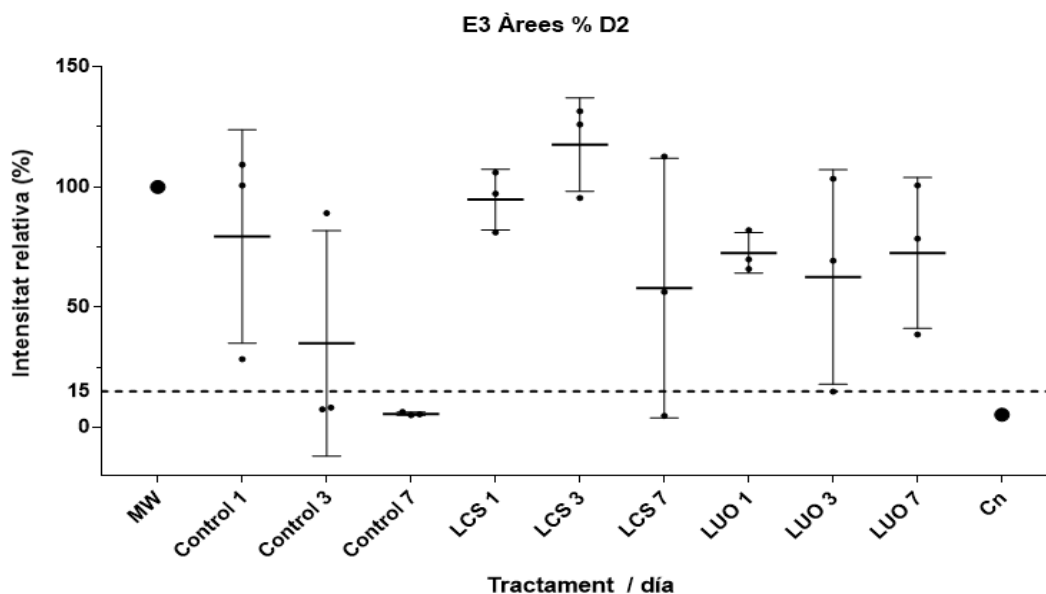


Figura 8: Gel d'electroforesi de la PCR d'amplificació dels primers per al STR D2S1338 de les mostres de l'estudi 3
LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; C=control negatiu



Gràfica 16: Representació en gràfic de columnes dels percentatges de les àrees sota la corba de les mostres de la superfície no porosa i del STR D2S1338 estretes a partir de la Taula 5 de l'Annex 8.3. LCS=Lumiscene; LUO=LumiUCIO; MW=marcador de pes molecular; Cn=control negatiu

En els dos STRs, els controls de 3 i 7 dies són els que mostren pitjors resultats a diferència dels dos reactius. L'aigua destil·lada podria ser la causant de l'augment de la degradació del DNA a mesura que avança el temps, però resulta que en la quantificació donava resultats superiors en els mateixos dies respecte els reactius. Per tant, podríem dir que encara que el grup control ens permeti recuperar més quantitat de DNA, la seva qualitat és inferior comparada amb la resta de grups.

En canvi, els dos reactius han mostrat que, encara que la quantitat de DNA extret hagi estat inferior, segurament degut a la presència d' H_2O_2 i de luminol, aquest era de major qualitat. Això podria ser degut a la presència del NaOH, que s'ha vist que ajuda a preservar la integritat del DNA. (Özdemir, 2021). A més a més, veiem que el LCS dona lleugerament millors resultats en el gel D2, segurament degut a la menor concentració de luminol i d' H_2O_2 .

Es va realitzar un test ANOVA d'un sentit en els resultats de les intensitats relatives dels gels. Aquest test mostra que no hi ha diferències significatives entre els diferents tractaments ni entre el temps tardat en processar la mostra, a excepció del grup control on hi ha significança estadística entre el dia 1 i el 7.

Les limitacions d'aquest estudi han estat, per una banda, la impossibilitat de recuperar la totalitat dels 40 µL de sang dipositada sobre el portaobjectes i, per l'altra, que els *primers* utilitzats estaven pensats per separar-los mitjançant electroforesis capil·lar. Aquests donaven bastantes bandes inespecífiques d'intensitats i mida similars a les desitjades. Sumat a les bandes addicionals, la mida del gel va impossibilitar la correcta separació de les bandes, que va dificultar la visualització dels gels. Tot i així, es va poder concretar quines eren les bandes que corresponien als amplicons desitjats.

5. Conclusions

Un cop explicats tots els resultats dels 3 estudis, es hora de posar-los en comú. Pel què fa a l'estudi 1, quan només mirem la intensitat, el millor reactiu és el LumiUCIO amb diferència. És el que proporciona una intensitat major i duradora en el temps respecte el Lumiscene i el Bluestar. Una intensitat major per part del reactiu permetria als investigadors veure de manera més clara les restes de sang latent en l'escena del crim i, per tant, tenir més poder de detecció. A més a més, donaria una mica de marge en les condicions de foscor necessàries en la resta de reactius.

Quan mirem com afecta el reactiu al DNA, veiem que el Lumiscene i el LumiUCIO han donat resultats més o menys similars, tant en l'estudi 2 com en el 3. Si mirem primer en termes de quantitat de DNA extret, dona millors resultats el Lumiscene respecte el LumiUCIO en ambdós estudis, això és degut a que el Lumiscene te menys concentració d'H₂O₂ i de luminol que el LumiUCIO. Com s'ha dit anteriorment, el Lumiscene supleix la falta de luminol amb la fluoresceïna, la qual no malmet el DNA. En canvi, quan s'avalua la qualitat d'aquest DNA, veiem que en l'estudi 2, en ambdues superfícies, el LumiUCIO ha aconseguit amplificar els dos STRs quasi bé en totes les mostres avaluades. En canvi, en l'estudi 3 veiem que els dos reactius donen resultats similars.

Finalment, amb els resultats observats en el conjunt dels 3 estudis es pot concloure que: el reactiu LumiUCIO ha donat millors resultats que el reactiu Lumiscene en 3 de les 4 característiques que es volien avaluar en aquest treball, en intensitat i durada de l'emissió de quimioluminescència i en qualitat del DNA extret. El Lumiscene hauria donat millors resultats en quantitat de DNA extret de la mostra original. Aquests resultats però,

no tenen un suport estadístic que digui que un reactiu és millor que l'altre, no obstant, aquestes son les dades obtingudes.

Aquest treball ha estat un primer apropament en la comparació d'aquests dos reactius i com a possibles nous projectes, seria recomanable la repetició dels estudis realitzats millorant la metodologia i afegint noves variables: mesurar la intensitat de la quimioluminescència en mostres de sang seques, mesurar com afecta la temperatura del reactiu en ser aplicat, augmentar la varietat de superfícies on dipositar la sang, utilitzar quantitats mínimes de sang i/o combinar l'estudi 2 i 3.

Per acabar, encara que disposem d'aquests reactius que ens permeten desvelar on estan amagades restes de sang latent que són impossibles de veure a ull nu, aquest ha de ser l'últim recurs perquè, com s'ha dit al principi del treball, les restes de sang trobades en un escena del crim haurien de ser recollides amb la mínima alteració possible per evitar al màxim la pèrdua d'informació.

6. Agraïments

Amb aquest apartat vull donar gràcies a les persones que m'han ajudat i donat suport en la realització d'aquest Treball de Final de Màster.

Primer voldria donar les gràcies al tutor acadèmic i coordinador del màster de Genètica, Física i Química Forense, el Dr. Raúl Beltrán Debón, per haver-me guiat i ajudat en la realització de la part pràctica, i per les moltes extraccions de DNA realitzades.

A la Dra. Maria Isabel Araque Granados, la millor tècnic de laboratori que m'he trobat, amb ella he après molts trucs i tècniques per millorar la meua habilitat dins d'un laboratori. Moltes gràcies per tots els consells i l'ajuda prestada durant el desenvolupament de la feina pràctica.

Al Dr. Josep Maria Serres i a Víctor Llamas per la seva ajuda en l'estudi 1, per deixar-me els seus laboratoris i per cedir-me el codi de Matlab.

A Ubaldo Fernández Alonso i Jose Manuel Mejuto Escudero de la Unitat Central d'Inspeccions Oculars (UCIO) de la Divisió de Policia Científica del Cos de Mossos

d'Esquadra per l'oportunitat de poder fer aquest treball i per la confiança dipositada en mi.

I per últim agrair a familiars i amics que m'han donat el seu suport incondicional durant aquests mesos de treball.

7. Bibliografia

- National Center for Biotechnology Information. (2021). *PubChem Compound Summary for CID 16850, Fluorescein*. Consultat el 30 / Juliol / 2021, a <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluorescein>
- American Society of Hematology . (20 / Juliol / 2021). *Blood Basics*. Recollit de <https://www.hematology.org/education/patients/blood-basics>
- Andersson, R. (2017). *An Evaluation of Two Presumptive Blood Tests and Three Methods to Visualise Blood*. Linköping University, Department of Physics, Chemistry and Biology, Linköping.
- Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M., & Lago, G. (9 / Gener / 2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72, 896-913.
- Bluestar Forensics. (2021). *Bluestar Forensic Latent bloodstain reagent*. Monte Carlo.
- Blum, L. J., Esperança, P., & Rocquefelte, S. (2006). A NEW HIGH-PERFORMANCE REAGENT AND PROCEDURE FOR LATENT BLOODSTAIN DETECTION BASED ON LUMINOL CHEMILUMINESCENCE. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 39(3), 81-100.
- Cheyne, M. (2011). *Illuminating Latent Blood*. Auckland: The Unibersity of Auckland.
- Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). *ImageUser Guide 1.46r*.
- Fleming, D. (2002). *The Chemiluminescence of Luminol*. Consultat el 1 / August / 2021, a The Chemiluminescence of Luminol: <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/mechanism.htm>
- Kapralov, A., Vlasova, I. I., Feng, w., Maeda, A., & al., e. (30 / October / 2009). Peroxidase Activity of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes: COVALENT AGGREGATION AND OXIDATIVE STRESS IN PLASMA AND MACROPHAGES. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30395-30407.
- Life Technologies Corporation. (2014). *Quantifiler® Human and Y Human Male DNA Quantification Kits*. Carlsbad.
- Loci Forenciscs B.V. (2000-2021). *Lumiscene*. Consultat el 3 / Agost / 2021, a Lumiscene: <https://www.lociforensics.nl/lumiscene/lumiscene/>
- Norrgard, K. (2014). *Forensics, DNA Fingerprint, and CODIS*. Consultat el 21 / Juliol / 2021, a <https://www.nature.com/scitable/topicpage/forensics-dna-fingerprinting-and-codis-736/>
- Özdemir, D. (25 / Febrer / 2021). A practical, low-cost, short-term storage method for genomic DNA. *Bio Techniques*, 70(4).

- Promega Corporation. (2013). *DNA IQ™ System—Small Sample Casework Protocol*. Madison.
- Stoica, B. A., Bunescu, S., Neamtu, A., Bulgaru-Iliescu, D., Foia, L., & Botnariu, E. G. (2016). Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *Journal of Forensic Science*, 61(5).
- Thermo Fischer Scientific Inc. (2016). *Thermo Scientific DreamTaq PCR Master Mix (2X)*. Carlsbad.
- Tobe, S. S., Watson, N., & Nic Daeïd, N. (Gener / 2007). Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA. *Journal of Forensic Science*, 52(1), 1.

8. Annexos

8.1. Codi Matlab del tractament de dades de l'Estudi 1

```
clear all
close all
lambdacentral=0; %longitud de onda a la que quereis medir. Si
pones 0 automaticamente te encuentra EL MAXIMO
tiempo=-1; %tiempo en minutos al que quieres medir el
espectro si pones un numero negativo te busca el max
K=1; %constante de conversión;
nombremetadatos='metadatos'; % nombre del archivo metadatos
nombre='espectroluolm'; %nombre del archivo datos

metadatos=xlsread([nombremetadatos, '.xlsx']);
I=K*xlsread([nombre, '.xlsx']);
I=medfilt2(I,[1 5]);
lambda=metadatos(1:2028);
t=metadatos(2029:length(metadatos));

figure (1) %Representación de t vs lambda.
surf(lambda,t,I)
colormap(jet(512))
shading interp
colorbar
% caxis([1*10^4 1.3*10^4])
hcb=colorbar;
title(hcb, 'Int')
title('Intensitat')
xlabel('lambda (nm)')
ylabel('Temps (min)')
axis tight
view(2)
%%
ruido=mean(I(:,100))*ones(length(t),1); %elijo una zona alejada
del espectro que quiero medir como ruido
```

```
if (lambdacentral~=0)
n=find(abs(lambda-lambdacentral)==min(abs(lambda-
lambdacentral)));
It=I(:,n)';    %Este es si quereis el decay a una longitud de onda
especifica
%It=max(I');    %este es si solo quereis el pico máximo sin
necesitar la longitud de onda
else
    maximo=max(max(I));
    [x,y]=find(I==maximo);

    ny=y(1);
    It=I(:,ny)';
end

windowSize = 5;
b = (1/windowSize)*ones(1,windowSize);
It=filter(b,1,It);

figure(2)
plot(t,ruido,t,It);
title('Intesitat durant el temps')
xlabel('Temps (min)')
ylabel('Intensitat (A.U.)')
legend('Soroll de fons','Senyal')

%%
if tiempo>0
    n2=find(abs(t-tiempo)==min(abs(t-tiempo)));    %calculamos
el tiempo y lo graficamos

else
    n2=x(1);
end
tn=num2str(t(n2));
```

```
figure(3)
plot(lambda,I(n2,:));
title(['Espectre a t=',tn, 's'])
xlabel('lambda')
ylabel('Intensitat (A.U.)')

% Creamos dos ficheros para guardar el decay y el espectro
It=It'-ruido;
fileID = fopen(['decay_',nombre,'.txt'],'w');
    fprintf(fileID,'    t          I_max \r\n');
for i=1:length(t)
    fprintf(fileID,'%f %f \r\n',t(i),It(i));
end
fclose(fileID);

fileID = fopen(['espectro_',nombre,'.txt'],'w');
    fprintf(fileID,'    lambda          I \r\n');
for i=1:length(lambda)
    fprintf(fileID,'%f %f \r\n',lambda(i),I(n2,i)-max(ruido));
end
fclose(fileID);
```

8.2. Taules de dades de l'Estudi 2

Taula 1: Dades de la quantificació de DNA per qPCR del estudi 2 superfície no porosa.

(ng/ul)	SN Control	SN LCS	SN LUO
Dia 1	3,75	1,4	1,75
Dia 15	2,03	1,08	0,42
Dia 30	3	1,55	0,63
Dia 45	0,55	0,25	0,19
Dia 60	4,22	0,7	0,19
R²	0,0034	0,4435	0,6658

Taula 2: Dades de la quantificació de DNA per qPCR del estudi 2 superfície porosa.

(ng/ul)	SP Control	SP LCS	SP LUO
Dia 1	0,06*	0,31	0,79
Dia 15	1,7	1,79	0,93
Dia 30	0,8	0,68	0,39
Dia 45	2,11	0,64	0,28
Dia 60	7,62*	0,81	0,27
R²	0,0946	0,0018	0,757

*Els valors marcats amb asterisc no es tenen en compte per la R²

Taula 3: Valors de les àrees sota el gràfic extreïdes de l'anàlisi amb ImageJ de les fotografies dels gels d'electroforesi corresponents a la visualització dels STR de les mostres de l'estudi 2 i valors segons el seu percentatge d'intensitat respecte el de la banda del marcador de pes molecular de 200pb.

Carril	Àrea D19 SN (A.U.)	Àrea D2 SN (A.U.)	% D19SN	% D2SN	Àrea D19 SP (A.U.)	Àrea D2 SP (A.U.)	% D19 SP	% D2 SP
MW 200pb	22841	12567	100	100	26651	13142	100	100
Control 1d	31626	35187	138,5	280,0	21165	13809	79,4	105,1
Control 15d	22056	43280	96,6	344,4	673	494	2,5	3,8
Control 30d	50552	43184	221,3	343,6	7089	24827	26,6	188,9
Control 45d	137	174	0,6	1,4	617	1599	2,3	12,2**
Control 60d	143	318	0,6	2,5	654	84	2,5	0,6
LCS 1d	21784	34217	95,4	272,3	676	22928	2,5	174,5
LCS 15d	31962	41990	139,9	334,1	54328	48370	203,9	368,1
LCS 30d	37372	46506	163,6	370,1	670	4788	2,5	36,4
LCS 45d	144	13649	0,6	108,6	653	884	2,5	6,7
LCS 60d	134	14038	0,6	111,7	3411	8583	12,8	65,3
LCS 1d	34459	47309	150,9	376,5	639	12922	2,4	98,3
LCS 15d	28113	37781	123,1	300,6	18783	37132	70,5	282,5
LCS 30d	18424	39675	80,7	315,7	4001	11787	15	89,7
LCS 45d	23502	14284	102,9	113,7	29096	24281	109,2	184,8
LCS 60d	136	10641	0,6	84,7	5745	11415	21,6	86,9
C. negatiu	144	7493	0,6	59,6*	-	-	-	-

*El valor no correspon amb l'esperat per les raons explicades anteriorment

** En la Il·lustració 4 no s'observa banda, però la brutícia del gel fa que doni per sobre de 10%

8.3. Taules de dades de l'Estudi 3

Taula 4: Dades de la quantificació per qPCR de les mostres de l'estudi 3.

	Dia 1 (ng/ μ L)	Dia 3 (ng/ μ L)	Dia 7 (ng/ μ L)
Control	1,97	1,71	1,94
	5,37	1,42	0,91
	6,18	2,57	2,37
Mitjana	4,51	1,9	1,7
Desviació Est.	2,23	0,6	0,75
LCS	6,78	3,39	1,36
	4,03	0,49	1,22
	0,1	0,76	0,45
Mitjana	3,64	1,55	1,01
Desviació Est.	3,36	1,60	0,49
LUO	0,55	0,15	0,25
	0,81	1,04	0,23
	2,3	0,16	1,07
Mitjana	1,22	0,45	0,52
Desviació Est.	0,94	0,51	0,48

Taula 5: Valors de les àrees sota el gràfic extretes de l'anàlisi amb ImageJ de les fotografies dels gels d'electroforesi corresponents a la visualització dels STR de les mostres de l'estudi 3 i valors segons el seu percentatge d'intensitat respecte el de la banda de 200pb

Carril			Àrees D19	Àrees D2	% D19	% D2
Control	1	a	10252	3334	95,6	28,4
		b	10366	11809	96,6	100,6
		c	12642	12840	117,9	109,3
	3	a	201	960	1,9	8,2
		b	9783	10462	91,2	89,1
		c	536	881	5,0	7,5
	7	a	529	595	4,9	5,1
		b	265	752	2,5	6,4
		c	310	634	2,9	5,4
LCS	1	a	15955	12449	148,8	106,0
		b	9631	11409	89,8	97,2
		c	11442	9520	106,7	81,1
	3	a	14623	14796	136,3	126,0
		b	12212	15441	113,9	131,5
		c	8784	11206	81,9	95,4
	7	a	11863	13233	110,6	112,7
		b	15306	563	142,7	4,8
		c	14379	6623	134,1	56,4
LUO	1	a	13790	8210	128,6	69,9
		b	12281	7744	114,5	65,9
		c	16874	9630	157,3	82,0
	3	a	13879	12139	129,4	103,4
		b	17441	1744	162,6	14,9
		c	7493	8139	69,9	69,3
	7	a	13735	9223	128,1	78,5
		b	11674	11809	108,9	100,6
		c	14696	4538	137,0	38,6
C-			830	613	7,7	5,2
MW			10725	11742	100	100