

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SECCIÓN EN LABORATORIO CLÍNICO**



**INFORME FINAL DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN:
EN GENÉTICA FORENSE EN EL LABORATORIO CLÍNICO**

TÍTULO DEL INFORME FINAL:

TRAZAS DE ADN Y SU PERSISTENCIA EN DIFERENTES SUPERFICIES: UN ESTUDIO A LARGO PLAZO QUE INVESTIGA LA INFLUENCIA DEL TIPO DE SUPERFICIE Y CONDICIONES AMBIENTALES.

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE:
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**

PRESENTADO POR:

GARCÍA ALVAREZ, ADRIANA YAMILETH	N° DE CARNET GA15040
MELENDEZ REYES, JENIFER NATALY	N° DE CARNET MR19153
TORRES BENAVIDES, JONATHAN MANUEL	N° DE CARNET TB19001

DOCENTE ASESOR:

LICDA. XIOMARA DE PASTORE

OCTUBRE DE 2024
SAN MIGUEL, EL SALVADOR CENTROAMÉRICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
AUTORIDADES**



**MSC. JUAN ROSA QUINTANILLA
RECTOR**

**DRA. EVELYN BEATRIZ FARFAN
VICERRECTORA ACADEMICA**

**MSC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

**LIC. PEDRO ROSALIO ESCOBAR CASTANEDA
SECRETARIO GENERAL**

**LIC. CARLOS AMILCAR SERRANO RIVERA
FISCAL GENERAL**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA ORIENTAL
AUTORIDADES**



**MSC. CARLOS IVAN HERNANDEZ FRANCO
DECANO**

**DRA. NORMA AZUCENA FLORES RETANA
VICEDENACA**

**LIC. CARLOS DE JESUS SANCHEZ
SECRETARIO**

**DR. AMADEO ARTURO CABRERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**MSC. MARTA LILIAN RIVERA
COORDINADORA DEL PROCESO DE GRADO DE LA CARRERA DE
LABORATORIO CLÍNICO**

INDICE

Resumen.....	1
1.1 Abstract.....	2
1.2 Desarrollo y Contenido.....	3
1.3Reflejos.....	3
1.4 Introducción.....	4
1.5 Materiales y métodos.....	4
1. 6 Conclusión.....	19
1.7 Bibliografía.....	20

Resumen

La comprensión actual del ADN traza sigue siendo limitada, pero está aumentando rápidamente. Se reconoce que los depósitos de trazas de ADN contienen secreciones de huellas dactilares, ADN celular (nucleado/anucleado), y ADN libre de células (cfDNA), entre otros posibles constituyentes, como el ADN extranjero/de fondo y cremas. Diseñar experimentos de ADN de manera que se puedan observar los componentes de las muestras de ADN traza y minimizar el impacto que las variables de transferencia tienen en las observaciones de persistencia es una tarea complicada.

Hay tres factores principales que afectan la persistencia del ADN: el tiempo, las condiciones ambientales y el tipo de superficie. Es bien sabido que el tiempo es un factor importante que influye en la persistencia del ADN y que el ADN puede persistir durante más de 6 semanas. Y posiblemente mucho más tiempo en condiciones óptimas de almacenamiento en laboratorio. La dificultad para recuperar el ADN de las superficies metálicas es un tema bien establecido, pero no comprendido. Dado que la munición de las armas de fuego está hecha principalmente de latón gran parte de la literatura que investiga la transferencia, recuperación y análisis de ADN de superficies metálicas se centra en el latón. El latón es una aleación compuesta de cobre y zinc, cada uno de los cuales es conocido como inhibidor de la PCR. Además de la inhibición de la PCR, el ADN es susceptible al daño oxidativo que se produce cuando el ADN entra en contacto con superficies que contienen cobre. Se cree que tanto la inhibición de la PCR como el daño al ADN contribuyen a las dificultades únicas encontradas al recuperar y analizar los depósitos de trazas de ADN recolectados del latón y otros metales, a diferencia de las superficies no metálicas. Aunque el latón es un metal de gran interés en las investigaciones forenses, algunas publicaciones exploran la recuperación de trazas de ADN de otros metales, el terrorismo y el uso de artefactos explosivos improvisados, y los delitos contra la vida silvestre todo lo cual demuestra las dificultades únicas en la recuperación de ADN de metales.

El objetivo de este proyecto es identificar tendencias en la persistencia del ADN traza e indicar cómo las diferentes condiciones ambientales de almacenamiento y las características de la superficie objetivo influyen en la persistencia a lo largo del tiempo.

Palabras Claves: AND traza; condiciones ambientales; metales; latón.

1.1 Abstract

The work presented herein is a large-scale persistence project aimed to identify trends in the persistence of trace DNA and indicate how different environmental storage conditions and target surface characteristics influence the persistence of cellular and cell free DNA (cfDNA) over time. To eliminate variation within the experiment we used a proxy DNA deposit consisting of a synthetic fingerprint solution, cellular DNA, and/or cfDNA. Samples were collected and analysed from 7 metals over the course of 1 year (27 time points) under 3 different environmental storage conditions.

The results of this experiment show that metal type greatly influences DNA persistence. For instance, copper exhibited an expected poor DNA persistence (up to 4 h) which a purification step did not help increase the DNA yield. Alternatively, DNA can persist for up to a year on lead at levels potentially high enough to allow for forensic DNA testing. Additionally, this study showed that the sample storage environment had no impact on DNA persistence in most cases. When considering DNA type, cfDNA was shown to persist for longer than cellular DNA and persistence as a whole appears to be better when DNA is deposited as mixtures over when deposited alone. Unsurprisingly, it can be expected that DNA recovery rates from trace deposits will decrease over time. However, DNA decay is highly dependent on the metal surface and extremely variable at short time points but slightly less variable as time since deposition increases. This data is intended to add to our understanding of DNA persistence and the factors which affect it.

Keywords: Trace DNA; persistence; synthetic fingerprint solution; cellular DNA.

1.2 Desarrollo y contenido

En este estudio, evaluamos la capacidad de tres tipos diferentes de ADN (cfDNA, ADN celular y una mezcla) de persistir en siete metales diferentes (aluminio, latón, cobre, acero galvanizado, plomo, acero dulce y estaño) en tres condiciones ambientales definidas (normal, oscuro y húmedo).

Los datos presentados en este estudio muestran cómo el tipo de metal puede influir fuertemente en la persistencia del ADN, siendo el cobre y el latón los que proporcionan los tiempos de persistencia más cortos y el plomo, quizás sorprendentemente, lo que permite que el ADN persista durante todo el período de 1 año.

Además, en este estudio, observamos que diferentes factores ambientales no tuvieron un efecto tan marcado como se podría esperar, mostrando solo un efecto estadísticamente significativo en la persistencia de tres metales: plomo, acero galvanizado y acero dulce. Los datos también muestran que en los metales el cfDNA persiste durante más tiempo que el ADN celular, especialmente cuando se deposita como una mezcla, lo que, como se explicó anteriormente, probablemente se deba a una combinación de la protección del ADN por las proteínas celulares y los efectos potencialmente inhibidores de la superficie del metal sobre las enzimas celulares. Esto puede sugerir que el cfDNA constituye la mayoría del ADN recuperable en depósitos de trazas, sin embargo, se necesitaría más trabajo para investigar esto en profundidad para confirmar la teoría.

1.3 Reflejos

- El ADN tiene la capacidad de persistir en el plomo hasta por un año.

- Es probable que la mala persistencia del ADN en el cobre se deba al daño del ADN, no a la inhibición de la PCR.
- El ADN libre de células persiste durante más tiempo que el ADN celular en los metales.
- La tasa de pérdida de ADN depende en gran medida de los metales.
- En muchos casos, las condiciones ambientales no influyeron en la persistencia del ADN.

Introducción

La persistencia de trazas de ADN no se ha investigado lo suficiente y hay pocos datos disponibles sobre la persistencia del ADN en diferentes condiciones ambientales y en diferentes materiales. El objetivo de este estudio es aumentar los datos disponibles sobre este tema, lo que, a su vez, ayudaría a los biólogos forenses a gestionar las expectativas al presentar tipos específicos de pruebas para análisis de ADN.

El trabajo presentado es un proyecto de persistencia a gran escala cuyo objetivo es identificar tendencias en la persistencia de ADN traza e indicar cómo las diferentes condiciones ambientales de almacenamiento y las características de la superficie objetivo influyen en la persistencia del ADN celular y libre de células (cfDNA) a lo largo del tiempo. Los resultados de este experimento muestran que el tipo de metal influye en gran medida en la persistencia del AD.

Materiales y métodos

➤ v Muestra de ADN

El componente libre de células utilizado para este estudio provino de la trucha arcoíris. Los cuales fueron donados por un pescador local. Se quitaron los hígados de trucha. Y el ADN se extrajo de ellos utilizando un protocolo estándar de fenol/cloroformo.

➤ Solución sintética de huellas dactilares

La solución sintética de huellas dactilares se creó siguiendo el procedimiento descrito por Sisco con algunas pequeñas modificaciones como destacado en Arsenault. Una solución ecrina sintética y otra de sebo sintético se hicieron por separado y se mezcló para crear una emulsión sintética que luego se diluyó para crear la solución sintética para huellas dactilares.

➤ Soluciones de depósito de ADN

Se prepararon tres soluciones de depósito en tubos separados de 50 ml.

➤ Superficies metálicas

Las superficies metálicas utilizadas en este experimento fueron: aluminio, latón, cobre, acero galvanizado y acero.

➤ Almacenamiento de muestras en condiciones ambientales simuladas.

Todas las muestras se almacenaron en cajas de plástico transparente con tapas bien cerradas en tres condiciones ambientales; en el primero las muestras de condiciones ambientales fueron expuestas a la luz natural. Disponible dentro de la sala de almacenamiento y en lo sucesivo se le denominará muestras "normales".

➤ Diseño experimental.

En este estudio de persistencia a largo plazo, las tres soluciones de ADN diferentes fueron depositadas, por triplicado, en 7 diferentes superficies metálicas.

➤ Puntos de tiempo experimentales.

Este experimento se desarrolló en dos fases. Fase 1 involucrada la configuración de las muestras puntuales a largo plazo que se depositaron en marzo 22 de mayo de 2021 y cobrado mensualmente a partir del 22 de mayo de 2021. Toda la fase una de las muestras se almacenó en las instalaciones seguras de la escena del crimen antes mencionadas en las condiciones ambientales indicadas.

- Colección de muestra.

Todas las muestras se recogieron utilizando un solo hisopo con punta de algodón.

- Extracción de ADN.

Los hisopos de algodón se extrajeron como lo describe Gray.

- purificación de ADN.

Las muestras seleccionadas fueron elegidas para someterse a un paso de purificación y concentración.

- Cuantificación de ADN y análisis de datos.

En resumen, el ADN celular y el cfDNA se cuantificaron, por duplicado, mediante una PCR en tiempo real StepOnePlus.

Temperatura y humedad.

Se registraron dos conjuntos de datos de temperatura y humedad que monitorearon las condiciones ambientales en las que se almacenaron las muestras.

El primer conjunto de datos se recopiló de la sala de almacenamiento y el segundo conjunto se recopiló de un contenedor de almacenamiento húmedo (cobre). Se asumió que los datos obtenidos de la caja de almacenamiento de cobre húmedo eran representativos de las condiciones ambientales en todas las cajas húmedas.

1. Persistencia del ADN

Se recogieron muestras triplicadas en 27 momentos y se analizaron por qPCR por duplicado en intervalos que oscilaron entre 0 h y 12 meses. Para todos los tipos de elementos, se utilizó el valor de tiempo cero (ng) al calcular el porcentaje de recuperación, ya que representa la cantidad máxima de ADN que se espera razonablemente recuperar de la superficie (ya que se recuperó inmediatamente

después de la deposición) y, posteriormente, se consideró el valor de recuperación del 100 %. Todos los datos se presentan como gráficos de porcentaje de recuperación versus tiempo logarítmico en horas.

Después de dos puntos de tiempo consecutivos en los que el ADN fue indetectable, se interrumpió la recolección y el análisis del tipo de muestra. El último momento en el que se finalizó la recolección y el análisis de cada metal es el siguiente:

- Plomo 8064 h (12 meses)
- Acero galvanizado 4704 h (7 meses)
- Aluminio 2688 h (4 meses)
- Acero dulce 672 h (4 semanas)
- Estaño 672 h (4 semanas)
- Latón 24 h
- Cobre 4 h

2. Plomo

Inicialmente, la recuperación del cfDNA en condiciones normales y húmedas es comparable, mientras que la recuperación en condiciones oscuras produjo valores ligeramente inferiores de manera constante en los puntos temporales posteriores, el grado de persistencia diverge con las condiciones oscuras y húmedas, lo que da lugar a una disminución más rápida en la recuperación que en las muestras normales.

El examen de los datos presentados para los puntos temporales largos, verifica que las muestras almacenadas en condiciones normales demuestran la mejor persistencia, seguidas de las oscuras y húmedas. Al considerar el cfDNA en los depósitos mixtos, el ADN persiste durante toda la duración del curso temporal. sin embargo, hay una notable diferencia en el patrón de persistencia a lo largo del curso temporal en comparación con los depósitos que contienen solo cfDNA.

Las muestras almacenadas en condiciones húmedas mostraron la mejor persistencia, seguidas por las muestras en condiciones oscuras.

Se observa que a medida que pasa el tiempo, las muestras almacenadas en la oscuridad persisten mejor que las muestras almacenadas en condiciones húmedas o normales. El ADN persiste entre el 10 % y el 40 % dependiendo de las condiciones de almacenamiento sin ninguna tendencia clara en la descomposición hasta la marca de 2 meses cuando la degradación parece acelerarse.

Los depósitos de ADN celular solitario muestran diferencias pronunciadas en la persistencia entre las condiciones de almacenamiento con el resultado inesperado de que la persistencia parece ser mejor para las muestras húmedas y más baja para las muestras oscuras. Sin embargo, en el caso del ADN celular en las muestras mixtas hay poca diferencia en la recuperación entre las condiciones de almacenamiento

Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del ADN en superficies de plomo, un porcentaje de recuperación más alto puede asociarse con la recuperación de cfDNA sobre el ADN depositado como células nucleadas. Esto sugiere que el cfDNA tiene una mayor capacidad de persistir en el plomo que el ADN celular. Además, las diferentes condiciones ambientales solo parecen tener un impacto significativo en el porcentaje de recuperación de ADN del plomo cuando el ADN se deposita solo como ADN celular. Cuando el ADN celular se deposita por sí solo, se produce un aumento significativo en el porcentaje de recuperación de las muestras almacenadas en condiciones húmedas en comparación con las muestras almacenadas en la oscuridad. Además, cuando el ADN celular se deposita por sí solo, se produce un aumento significativo en el porcentaje de recuperación de las muestras almacenadas en condiciones normales en comparación con las muestras almacenadas en la oscuridad.

3. Acero galvanizado

Los datos de persistencia para el acero galvanizado desde el tiempo cero hasta los 7 meses, ya que en este punto el ADN se volvió indetectable. La recuperación inicial (punto de tiempo de 1 h) de cfDNA del acero galvanizado produjo tasas de recuperación del 85 % o menos cuando se depositó solo y tasas del 100 % cuando se depositó como parte de una mezcla. La aparente recuperación del 100 % se considerará en la discusión.

En puntos de tiempo posteriores (2 h - 4704 h (7 meses)) cuando solo se depositó cfDNA, las muestras almacenadas en la oscuridad proporcionaron una recuperación marginalmente mejor, en comparación con las otras condiciones ambientales, hasta las 4 h. Después de 4 h, las muestras almacenadas en la oscuridad produjeron los segundos mejores resultados de recuperación hasta las 72 h (3 días), después de lo cual la recuperación de ADN cayó comparativamente baja entre todas las condiciones de almacenamiento. Además, en los puntos de tiempo posteriores, las muestras oscuras dan la mejor recuperación inicial, pero con una curva de desintegración pronunciada, dan rápidamente las tasas de recuperación más bajas.

Se muestra que es más probable tener una mejor recuperación de ADN del acero galvanizado si las muestras se almacenan en condiciones normales en comparación con las condiciones húmedas.

Sin embargo, los resultados exhibidos por la fracción libre de células de los depósitos de la mezcla produjeron una tendencia diferente. Las muestras almacenadas en la oscuridad, producen la mejor recuperación de las tres condiciones de almacenamiento hasta 24 h. Después de lo cual, la condición normal dio una recuperación de ADN marginalmente mejor hasta el final del período de recolección.

Las muestras almacenadas en un ambiente húmedo produjeron inicialmente valores de recuperación superiores a los observados para muestras normales; sin embargo,

después de 12 h, las condiciones húmedas produjeron consistentemente los resultados de recuperación de ADN más bajos.

Por el contrario, cuando el ADN celular se depositó solo, las muestras almacenadas en condiciones naturales produjeron la recuperación más alta de las tres condiciones de almacenamiento hasta 336 h (2 semanas), momento en el que las muestras oscuras produjeron los mejores resultados.

Las muestras húmedas dieron la recuperación de ADN más baja a pesar de tener inicialmente la segunda mejor recuperación que se vio rápidamente influenciada por una rápida descomposición.

Teniendo en cuenta la fracción celular de las muestras mixtas, las muestras almacenadas en condiciones normales dieron las tasas de recuperación iniciales más bajas y exhibieron una descomposición inicial acelerada después de la cual la persistencia se mantuvo relativamente estable hasta el final del transcurso temporal. A las 12 h, la recuperación de las muestras húmedas cayó por debajo de la de las muestras normales lo que significa que las muestras húmedas tuvieron la recuperación más baja hasta el final del período de recolección. En el corto plazo (hasta 8 h), las muestras húmedas proporcionaron la mejor recuperación y luego cayeron por debajo de la de las muestras oscuras. Después de esto, las muestras almacenadas en la oscuridad producen la recuperación más alta hasta 4704 h (7 meses).

Al reflexionar sobre los datos producidos para los puntos de tiempo largos, la persistencia de los tipos de ADN celular muestra lo que puede ser la tendencia esperada al considerar el impacto que puede tener el medio ambiente en la persistencia, ya que el ADN persiste mejor en la oscuridad, seguido de condiciones normales y luego húmedas.

Alternativamente, los datos producidos para la persistencia de cfDNA en los puntos de tiempo largos muestran una menor, pero aun así se espera una tendencia en la

que el ADN persiste mejor en condiciones normales, seguidas de condiciones oscuras y luego húmedas.

Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del cfDNA en superficies de acero galvanizado, se obtiene un porcentaje de recuperación más alto cuando se deposita en una mezcla con células nucleadas en puntos de tiempo cortos (menos de 1 mes). Sin embargo, esto no es así en un rango de tiempo más largo. Sin embargo, para el ADN celular, las mezclas parecen conducir a una mayor persistencia en puntos de tiempo más largos.

No obstante, el análisis estadístico de la recuperación de diferentes condiciones ambientales muestra que no afectan significativamente el porcentaje de recuperación de ADN del acero galvanizado cuando el cfDNA se deposita solo o en una mezcla.

Además, también hay una diferencia significativa en la recuperación de ADN entre las muestras almacenadas en la oscuridad y las almacenadas en condiciones húmedas.

4. Aluminio

Para el cfDNA, el punto de tiempo inicial de 1 h produjo tasas de recuperación del 70% o más, independientemente de las condiciones ambientales en las que se almacenaron las muestras o de si el ADN se depositó solo o en una mezcla.

Para los puntos de tiempo posteriores (2 h - 2688 h (4meses)) cuando solo se depositó cfDNA, las muestras almacenadas en la oscuridad proporcionaron una recuperación marginalmente mejor, en comparación con las otras condiciones ambientales, hasta las 24 h.

Desde las 24 h hasta el final del período de recolección, las muestras almacenadas en condiciones normales solo mostraron una mejor persistencia en comparación con las muestras oscuras. Las muestras almacenadas en condiciones húmedas se degradaron más rápido y después de 12h produjeron consistentemente el porcentaje de recuperación más bajo de todas las condiciones ambientales.

Sin embargo, los datos obtenidos del cfDNA en los depósitos de mezcla produjeron una tendencia más simplista. Las muestras almacenadas normalmente produjeron una mejor recuperación de ADN en comparación con las muestras almacenadas en condiciones oscuras o húmedas. Con respecto a las muestras almacenadas en condiciones oscuras y húmedas, solo hay una diferencia marginal en la recuperación a lo largo del tiempo, donde las muestras oscuras muestran consistentemente una mejor persistencia.

A diferencia del cfDNA, el ADN celular, ya sea depositado solo o en la mezcla, e independientemente de las condiciones de almacenamiento, tuvo una tasa de recuperación inicial (punto de tiempo de 1 h) mucho menor, con un máximo del 20%. Cuando solo se depositó ADN celular, los datos muestran que las muestras almacenadas en condiciones de oscuridad tuvieron la mejor recuperación durante el transcurso del tiempo. Sin embargo, solo se observaron tasas de recuperación marginalmente más bajas en las muestras almacenadas en condiciones húmedas. Las muestras almacenadas normalmente exhibieron la persistencia más pobre en todas las condiciones ambientales. Después de 72 h (3 días), todas las muestras que contenían solo el ADN celular dieron tasas de recuperación de menos del 0,7% independientemente de las condiciones de almacenamiento.

Teniendo en cuenta la fracción celular de las muestras mixtas almacenadas en la oscuridad, el ADN persiste a un nivel más alto hasta 24 h, después de lo cual las muestras almacenadas en todas las condiciones ambientales caen por debajo del 2,5% de recuperación. Las muestras almacenadas en la oscuridad exhiben una persistencia marginalmente mayor en el tiempo que los otros dos entornos.

Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del ADN en superficies de aluminio, un porcentaje de recuperación más alto puede asociarse con la recuperación de cfDNA sobre el ADN depositado en células nucleadas.

Esto sugiere que el cfDNA tiene una mayor capacidad de persistir en aluminio que el ADN celular. Además, las diferentes condiciones ambientales no afectan significativamente la persistencia del ADN en aluminio en ninguna circunstancia.

5. Acero dulce

Los datos de persistencia para el acero dulce se presentan desde el tiempo cero hasta las 4 semanas, ya que en este punto el ADN se volvió indetectable.

La recuperación inicial (momento de 1 h) de cfDNA del acero dulce produjo tasas de recuperación del 78% o más, independientemente de las condiciones ambientales en las que se almacenaron las muestras o de si el ADN se depositó solo o en una mezcla.

Para el cfDNA depositado solo, la persistencia sigue un patrón esperado donde las muestras almacenadas en la oscuridad tienen la mayor persistencia, seguidas de las muestras normales y luego las muestras húmedas.

Los resultados para el cfDNA en la mezcla muestran una tendencia similar sin embargo, dado que las muestras en la oscuridad tienen una descomposición más pronunciada que las muestras almacenadas en condiciones normales, las muestras almacenadas en la oscuridad no proporcionan de manera constante el mayor porcentaje de recuperación.

Los datos muestran que el cfDNA persiste mejor cuando se deposita como una mezcla con ADN celular que solo al considerar el período de tiempo de 96 a 672 h (4 días a 4 semanas).

El ADN celular, ya sea depositado solo o en una mezcla, independientemente del almacenamiento, tuvo una tasa de recuperación inicial (momento de 1 h) mucho menor, con un máximo del 28%.

Cuando solo se depositó ADN celular, los datos muestran que las muestras almacenadas en la oscuridad tuvieron la mejor recuperación hasta 8 h. Sin embargo, debido a la pronunciada descomposición asociada con las muestras oscuras, las muestras normales producen una mejor recuperación después de 8 h.

De manera similar al cfDNA almacenado en condiciones húmedas, la condición húmeda resultó en los tiempos de persistencia más cortos para el ADN celular depositado solo o en una mezcla.

Los datos también muestran que, en general, la persistencia del ADN celular aumenta ligeramente en presencia de cfDNA.

Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del ADN en superficies de acero dulce, se puede asociar un porcentaje de recuperación más alto con la recuperación de cfDNA sobre el ADN depositado en células nucleadas.

Esto sugiere que el cfDNA tiene una mayor capacidad para persistir en acero dulce que el ADN celular. Además, las diferentes condiciones ambientales no afectan significativamente la persistencia del ADN en acero dulce cuando el ADN se deposita como ADN celular (solo o en una mezcla) o solo como cfDNA. Sin embargo, cuando el cfDNA se deposita en una mezcla, hay un aumento significativo en el porcentaje de recuperación entre las muestras almacenadas en condiciones normales en comparación con las muestras almacenadas en condiciones húmedas. Además, la recuperación de ADN de las muestras almacenadas en la oscuridad fue aumentó significativamente en comparación con las muestras almacenadas en condiciones húmedas.

6. Estaño

Los datos de persistencia del estaño se presentan desde el momento cero hasta las 4 semanas, momento en el que el ADN se volvió indetectable. La recuperación de cfDNA del estaño produjo tasas de recuperación del 77 % o más altas, independientemente de las condiciones ambientales de almacenamiento y el tipo de depósito. Cuando se depositó cfDNA solo, los resultados muestran un resultado algo esperado, donde el ADN almacenado en condiciones normales y oscuras persistió mejor que las muestras almacenadas en condiciones húmedas. Las condiciones normales y oscuras produjeron tasas de recuperación casi idénticas y relativamente altas.

En contraste, las muestras húmedas mostraron tasas de recuperación más bajas y persistieron durante un período más corto.

Cuando el cfDNA se deposita como parte de una mezcla, la tendencia exhibida es ligeramente más complicada que cuando se deposita solo.

Además, cuando se deposita como parte de una mezcla, el cfDNA puede persistir durante un período más largo. Sin embargo, de manera un tanto sorprendente, las muestras de ADN almacenadas en condiciones oscuras produjeron las tasas de recuperación más bajas a lo largo del tiempo de las tres condiciones de almacenamiento. Las muestras almacenadas en condiciones normales y húmedas produjeron tasas de recuperación similares entre 1 y 4 h. Sin embargo, después de 4 h, las muestras húmedas se desintegraron más rápidamente, lo que significa que las muestras normales mostraron la mejor persistencia a lo largo del tiempo.

Por el contrario, cuando se depositó ADN celular, ya sea solo o como una mezcla, se produjo un máximo inicial (punto de tiempo de 1 h) de 63 % de recuperación, que es inferior a las tasas exhibidas por el cfDNA.

Cuando solo se depositó ADN celular, los datos muestran que las muestras con la mejor recuperación a lo largo de todo el tiempo se almacenaron en condiciones normales, seguidas en un cercano segundo lugar por las muestras almacenadas en la oscuridad. Además, de manera similar al cfDNA, cuando el ADN celular se deposita solo y se almacena en condiciones húmedas, muestra la persistencia más corta en el tiempo.

Teniendo en cuenta la fracción de ADN celular de las muestras mezcladas, los resultados son muy variables. Sin embargo, después de 4 h surge una tendencia entre las condiciones de almacenamiento. Las muestras de ADN almacenadas en condiciones normales y oscuras muestran una capacidad similar de persistencia, mientras que las muestras de ADN almacenadas en condiciones húmedas exhiben la persistencia más baja.

Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del ADN en superficies de estaño, se puede asociar un porcentaje de recuperación más alto con el cfDNA sobre el ADN depositado en células nucleadas. Esto sugiere que el cfDNA tiene una mayor capacidad de persistencia en estaño que el ADN celular.

En general, las diferentes condiciones ambientales no afectan significativamente la persistencia del ADN del estaño cuando el ADN se deposita como cfDNA o ADN celular solo o en una mezcla. Sin embargo, en todos los casos, excepto para el cfDNA en una mezcla, se encontró que las muestras de ADN almacenadas en condiciones normales o de oscuridad pudieron persistir más tiempo en cantidades mayores que las almacenadas en condiciones húmedas.

7. Latón

El ADN no persistió en ninguna forma durante más de 24 h en este metal. Cuando se depositó una solución que contenía solo cfDNA sobre latón, después de 1 h, las muestras almacenadas en la oscuridad produjeron una recuperación de ADN del 84%. Por el contrario, cuando las muestras de cfDNA se almacenaron en condiciones normales o húmedas, la capacidad del ADN para persistir después de 1 h se redujo y la recuperación cayó por debajo del 16 %.

La capacidad de recuperar cfDNA, depositado solo, disminuyó rápidamente y después de 4h se volvió completamente indetectable cuando se almacenó en cualquier condición ambiental. Como era de esperar, las muestras almacenadas en entornos oscuros y normales persistieron durante más tiempo en cantidades mayores que las almacenadas en condiciones húmedas.

Cuando el cfDNA se depositó como parte de una mezcla, la capacidad de recuperar la fracción libre de células siguió una tendencia diferente.

Los datos muestran que las muestras mixtas produjeron una mejor recuperación general en todas las condiciones de almacenamiento cuando el cfDNA se depositó en una mezcla que solo.

Como parte de una mezcla, el cfDNA se puede recuperar por encima del 73% una hora después de la deposición y por encima del 36% después de dos horas.

Cuando el ADN era detectable a las 4 h, la fracción libre de células de las muestras mixtas produjo una recuperación mucho mejor 48% que cuando se depositó solo 0.8%. Después de 4h, el cfDNA en mezclas exhibió la misma tendencia que cuando se depositó solo y se volvió completamente indetectable independientemente de la condición de almacenamiento. Como era de esperar, las muestras almacenadas en la oscuridad persistieron más tiempo en las cantidades más altas. Sin embargo, de manera algo sorprendente, las muestras húmedas persistieron en cantidades más altas durante más tiempo que las almacenadas en condiciones normales.

Por el contrario, el ADN celular, ya sea depositado solo o en la mezcla, persistió en el latón durante más tiempo que el cfDNA y produjo ADN recuperable hasta 12h. Cuando solo se depositó ADN celular, los datos muestran que las muestras con la mejor recuperación, hasta 24h, se almacenaron en condiciones húmedas.

Las muestras almacenadas en condiciones normales y oscuras produjeron consistentemente rendimientos bajos de ADN marginalmente diferentes en comparación con las muestras almacenadas en condiciones húmedas. Sin embargo, después de 4h, todas las muestras que contenían solo ADN celular arrojaron tasas de recuperación de menos del 0,018 % independientemente de la condición de almacenamiento.

Teniendo en cuenta la fracción celular de las muestras mixtas, el ADN almacenado en la oscuridad persistió constantemente en niveles más altos que las muestras almacenadas en condiciones normales o húmedas.

Además, las muestras almacenadas normalmente persistieron en los niveles más bajos a lo largo del tiempo. Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del ADN en las superficies de latón, se puede asociar un porcentaje de recuperación más alto con el ADN celular y el ADN cfDNA cuando se

depositan juntos, como parte de una mezcla, que por separado. Además, los datos sugerirían que el ADN depositado en forma de células nucleadas tiene una mayor capacidad de persistir en latón que el ADN cfDNA.

En general, las diferentes condiciones ambientales no afectan significativamente el porcentaje de recuperación de ADN del latón cuando el ADN se deposita como ADN celular o cfDNA solo o en una mezcla.

8. Cobre

Los datos de persistencia del cobre se presentan desde el momento cero hasta las 4h, ya que el ADN no persistió en ninguna forma durante más de 4 h en este metal. El punto de tiempo inicial 1 h muestra que la recuperación de cfDNA del cobre solo fue exitoso cuando el cfDNA se depositó como parte de una mezcla, independientemente de las condiciones ambientales en las que se almacenaron las muestras.

Además, en ningún momento se recuperó cfDNA de las muestras cuando se depositó solo. La recuperación inicial de cfDNA del cobre fue extremadamente baja, 1.2% y rápidamente se volvió indetectable 2h.

A diferencia del cfDNA, el ADN celular muestra una persistencia similar entre muestras depositadas solas o como parte de una mezcla. Además, la persistencia del ADN celular fue peor que la del cfDNA, produciendo una recuperación de menos del 0.04% solo 1h después de la deposición. Después de 1h, todas las muestras que contenían ADN celular, independientemente de su condición de almacenamiento, se volvieron rápidamente indetectables 4h.

Con base en los resultados presentados aquí, al considerar la persistencia del ADN en superficies de cobre, parecería que la recuperación de cualquier forma de ADN parece ligeramente más probable cuando el ADN celular y el cfDNA se depositan juntos en lugar de solos. Sin embargo, los resultados resaltan claramente que tanto el cfDNA como el ADN celular no persisten bien en un sustrato de cobre. Estos

datos también muestran que las diferentes condiciones ambientales no afectan significativamente la persistencia del ADN en el cobre.

Conclusión.

El trabajo presentado aquí es un proyecto de persistencia a gran escala destinado a identificar tendencias en la persistencia de trazas de ADN e indicar cómo las diferentes condiciones ambientales de almacenamiento y las características de la superficie objetivo influyen en la persistencia del ADN libre celular y celular (cfDNA) a lo largo del tiempo.

Los resultados de este experimento muestran que el tipo de metal influye en gran medida en la persistencia del ADN. Por ejemplo, el cobre exhibió una mala persistencia esperada del ADN hasta 4h que un paso de purificación no ayudó a aumentar el rendimiento de ADN. Alternativamente, el ADN puede persistir hasta un año en el plomo a niveles potencialmente lo suficientemente altos como para permitir pruebas forenses de ADN. Además, este estudio mostró que el entorno de almacenamiento de muestras no tuvo ningún impacto en la persistencia del ADN en la mayoría de los casos. Al considerar el tipo de ADN, se demostró que el ADNcf persiste durante más tiempo que el ADN celular y la persistencia en su conjunto parece ser mejor cuando el ADN se deposita como mezclas que cuando se deposita solo. Como era de esperar, se puede esperar que las tasas de recuperación de ADN de los depósitos de trazas disminuyan con el tiempo. Sin embargo, la desintegración del ADN depende en gran medida de la superficie del metal y es extremadamente variable en puntos de tiempo cortos, pero ligeramente menos variable a medida que aumenta el tiempo desde la deposición. Estos datos pretenden contribuir a nuestra comprensión de la persistencia del ADN y los factores que lo afectan.

Bibliografía

[1] J.J. Raymond, R.A.H. van Oorschot, S.J. Walsh, C. Roux, P.R. Gunn, Trace DNA and street robbery: a criminalistic approach to DNA evidence, *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 2 (2009) 544–546, <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2009.08.073>.

[2] D. Taylor, A. Biedermann, L. Samie, K.-M. Pun, T. Hicks, C. Champod, Helping to distinguish primary from secondary transfer events for trace DNA, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 28 (2017) 155–177, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.008>.

[3] B. Kokshoorn, M. Luijsterburg, Reporting on forensic biology findings given activity level issues in the Netherlands, *Forensic Sci. Int.* 343 (2023) 111545, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111545>.

[4] J. Burrill, B. Daniel, N. Frascione, A review of trace “Touch DNA” deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 39 (2019) 8–18, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.019>.

[5] R.A.H. van Oorschot, B. Szkuta, G.E. Meakin, B. Kokshoorn, M. Goray, DNA transfer in forensic science: a review, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 38 (2019) 140–166, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.014>.

[6] T. Kita, H. Yamaguchi, M. Yokoyama, T. Tanaka, N. Tanaka, Morphological study of fragmented DNA on touched objects, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 3 (2008) 32–36, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.09.002>.

[7] M. Poetsch, P. Markwerth, H. Konrad, T. Bajanowski, J. Helmus, About the influence of environmental factors on the persistence of DNA — a long-term study, *Int. J. Leg. Med.* (2022), <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02800-6>.

[8] L.Y.C. Lee, H.Y. Wong, J.Y. Lee, Z.B.M. Waffa, Z.Q. Aw, S.N.A.B.M. Fauzi, et al., Persistence of DNA in the Singapore context, *Int. J. Leg. Med.* 133 (2019) 1341–1349, <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02077-2>.

[9] C.M. Pfeifer, P. Wiegand, Persistence of touch DNA on burglary-related tools, *Int J. Leg. Med* 131 (2017) 941–953, <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1551-4>.

[10] R.A.H. van Oorschot, G. Glavich, R.J. Mitchell, Persistence of DNA deposited by the original user on objects after subsequent use by a second person, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 8 (2014) 219–225, <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.005>.