

EPIGENÉTICA: DESDE LA MEDICINA CLÍNICA A LA INVESTIGACIÓN FORENSE

EPIGENETICS: FROM CLINICAL MEDICINE TO FORENSIC INVESTIGATION

Pascual E.¹Castelló A.²¹Licenciada en Biología y Bioquímica. Máster en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida²Departamento de Medicina Legal y Forense.

Universitat de València.

España.

Correspondencia: Ana.Castello@uv.es

Resumen: La Epigenética ha adquirido en los últimos años una gran relevancia en la investigación genética. En principio por su posible aplicación en Medicina Clínica, al entender que puede proporcionar amplias posibilidades para el desarrollo de medios diagnósticos, de prevención y tratamiento. Como no podía ser de otra forma, la Ciencia Forense ha percibido el potencial de esta nueva herramienta de trabajo que podría contribuir a resolver algunas cuestiones que el estudio tradicional de ADN deja sin respuesta. En el presente trabajo se revisa ambos campos de aplicación, discutiéndose al final las condiciones necesarias para la aplicación de estos nuevos análisis a los casos prácticos relacionados con la investigación criminal.

Palabras clave: Epigenética, Metilación del ADN, Medicina Clínica, Ciencia Forense.

Abstract: Epigenetics has acquired in recent years a great importance in genetic research. First, for its possible application in Clinical Medicine, to understand that it can provide new opportunities for the development of methods to diagnostics, prevention and treatment. How could it be otherwise, Forensic Science experts have perceived the potential of this new tool that could help solve some issues that traditional DNA analysis leaves unanswered. In this study both areas of application are reviewed, discussing the necessary conditions for the implementation of this new analysis to case studies related to the criminal investigation.

Keywords: Epigenetics, DNA Metilation, Clinical Medicine, Forensic Sciences.

INTRODUCCIÓN

Tan solo año después de la publicación de los hallazgos de Johann Mendel¹, el biólogo alemán Ernst Haeckel² revolucionó a la comunidad científica al afirmar que el material que regula la herencia ocupa el núcleo de la célula³. Sus conclusiones recibieron un incuestionable apoyo tres años después, cuando se consiguió aislar por primera vez el contenido del núcleo celular. Esto último se debió a la curiosidad de un estudiante de Medicina a quien le llamó la atención una sustancia ácida y con alto contenido en fósforo, que estaba extrayendo su Maestro -Felix Hoppe-Seyler- de los glóbulos blancos obtenidos de restos de pus, procedentes a su vez de vendas quirúrgicas recientes. En su trabajo, reflejado en varios volúmenes de una extensa obra⁴, describe los procedimientos ideados para lograr aislar el valioso material oculto en el núcleo celular, al que bautizó como *nucleína*.

La presentación en sociedad de la nucleína se abre un largo camino, del que aún no se ha alcanzado la meta, dirigido a conocer más y mejor esa sustancia. Por una parte con el objetivo de determinar exactamente su composición

¹ Pueden leer más sobre las experiencias de Mendel en este enlace:

<http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/genmen/Gen%E9ticaMendeliana.pdf>

² Pueden leer su bibliografía en: <http://www.biografiasyvidas.com/biografia/h/haeckel.htm>

³ Al que tienen acceso a texto completo desde el siguiente enlace:

http://books.google.es/books/about/Generelle_Morphologie_der_Organismen.html?id=-pk5AAAAcAAJ&redir_esc=y

<http://tinyurl.com/nty7gd>

http://books.googleusercontent.com/books/content?req=AKW5Qaf9B5CEv2a1LjdwvkAhfm7kwxRiSg6sFc6rG1trhNzkL4y1az_3Q-Q-VH6_Z8rziEdYAuTIGyBuNqBdih27eZ1UUHbn6hqfDOVSNfRhZg-DtiMNGsSI2xIgmzckW3VikPE5fYWTYBAQOhrn2hcN4_pyi6HwUBXXeZnBhwP30x2TKZK4KR_RUBsL9KPMXCydhx6Nq6JBc_6UJWQR-epfnwqMZcyuW_yDpRd4ARZ9NVJq2pfsCj_M2r2_VWH-1EDm17mX8S438mvt4tXKqyYjYQ69ODA

⁴ La referencia del texto es la que sigue:

Miescher, Johann Friedrich. Die histochemischen und physiologischen Arbeiten, gesammelt u. hrsg. von seinen Freunden, Leipzig. Vogel, 1869

química. Fue un discípulo del profesor Hoppe-Seyler - Albrecht Kossel- el encargado de hacer saber que consta principalmente de algo tan simple como cuatro bases y azúcar⁵.

Por otra para demostrar si realmente era la responsable de la herencia genética. El descubrimiento de los cromosomas, los mecanismos de división celular⁶, junto con la publicación de los resultados realizados por diferentes investigadores, y cuyos resultados eran coincidentes, apuntaban a la nucleína como responsable de tan trascendental función⁷. Otras experiencias posteriores realizadas reproduciendo las experiencias de Mendel, sustituyendo en algunas de ellas los guisantes por las moscas de la fruta, confirmaron, por si hacía falta, las Leyes formuladas por el monje benedictino, demostrando además la posibilidad de la herencia ligada al sexo⁸.

Desde entonces, la nucleína –que fue rebautizada como ácido nucleico- desplazó definitivamente a las proteínas en el papel de trasmisor de la herencia.

A partir de ese momento, el esfuerzo de los expertos se ha dirigido en tres direcciones distintas, pero confluyentes.

La primera se dirige a confirmar la composición química del valioso material⁹. La segunda centra su esfuerzo en determinar la estructura de los ácidos nucleicos^{10 11 12} y la tercera destinada a conocer cómo trabaja, cuáles son los mecanismos por los que consigue realizar su función y cómo es controlada. Esta última es sobre la que hoy en día aún se sigue trabajando sin descanso.

Epigenética y Medicina

⁵ Kossel A. Ueber das Nuclein in der Hefe. Z. Physiol. Chem. 1879;3:284 – 291.

Disponible en:

<http://echo.mpiwg-berlin.mpg.de/ECHODOCUView?url=/permanent/vlp/lit16296/index.meta&pn=2>

Y en:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01653420#page-1>

⁶ “Sobre el comportamiento del núcleo en la división celular, y la importancia de las células polinucleares”

Flemming W. Ueber das Verhalten des Kerns bei der Zelltheilung und über die Bedeutung mehrkerniger Zellen Arch. Pathol. Anat. Physiol. 1879; 77:1–29.

Se puede leer parte del artículo tal como fue publicado, desde el siguiente enlace:

<http://link.springer.com/journal/428/77/1/page/1>

⁷ Algunos de los trabajos son los siguientes:

Hertwig O. Das Problem der Befruchtung und der Isotropie des Eies, eine Theorie der Vererbung. Jena, 1984.

Pueden ver la ficha del libro en este enlace:

http://www.worldcat.org/title/dasproblem-der-befruchtung-und-der-isotropie-des-eies-eine-theorie-der-vererbung/oclc/247743935&referer=brief_results

Kölliker A. Die Bedeutung der Zellenkerne für die Vorgänge der Vererbung. Leipzig, 1885.

Ficha en:

http://search.books2ebooks.eu/Record/zbz_006357822

⁸ Así se describe en el trabajo siguiente:

Correns C. G. Mendels Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde, Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 18 (1900), 158-168.

Que pueden leer traducido a inglés en:

<http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/holdings/c/cc-00.pdf>

⁹ Pueden leer su biografía en:

<http://www.jbc.org/content/277/22/e11>

¹⁰ “It will be seen that the findings summarized in Table VIII correspond to about 4 molecules of adenine and 5 of cytosine per 10 molecules of guanine”

Vischer E, Chargaff E. The composition of the pentose nucleic acids of yeast and pancreas. J Biol Chem. 1948;176(2):715-734.

Disponible en: <http://www.jbc.org/content/176/2/715.full.pdf>

¹¹ “We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.)”

Así comenzaba el artículo de referencia:

Watson JD, Crick FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 1953;171, 737-738.

Que pueden leer a texto completo en el siguiente enlace:

<http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/biocrs.biomed.brown.edu/Books/Chapters/Ch208/DH-Paper.html>

¹² La referencia del artículo es la siguiente:

Franklin RE, Gosling RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. Nature 1953;171(4356):740-741.

Los estudios desarrollados desde el siglo pasado han llevado a desenterrar una antigua hipótesis que fue dada de lado en su momento, cuando se asumió que el control absoluto de la herencia dependía de la secuencia de ADN. Se trata de aquella que asocia a factores ajenos a la secuencia la expresión de los genes e incluso apoya su implicación en su herencia.

Aunque hay referencias anteriores sobre la posible intervención de componentes ajenos a la molécula de ADN en su regulación y expresión, es en 1939 cuando se publica un artículo que la comunidad científica considera el germen de la moderna epigenética (1). Su autor la define como las interacciones entre los genes y determinados productos que son responsables del fenotipo. Hoy en día se entiende como el estudio de los cambios en las funciones de los genes, que pueden ser heredables o no serlo y que no se producen por variaciones de la secuencia de ADN (2).

Esos cambios pueden ser generados por distintos mecanismos. Los más estudios implican a las histonas o al proceso químico de la metilación.

La relevancia de la epigenética se demuestra cuando se analizan organismos con la misma secuencia de ADN comprobándose que son distintos. Esto sucede por la intervención de la epigenética que provoca que el fenotipo se modifique con el tiempo. Esta es la base de su uso en Ciencia Forense, como se verá en el apartado siguiente, para la diferenciación de gemelos monocigóticos, que son portadores del mismo ADN, pero pueden presentar diferente comportamiento, medidas, e incluso diferentes enfermedades, debido a que epigenéticamente son diferentes. Además, el análisis de la variación epigenética también permite estudiar cómo los seres humanos se adaptan al medio y a los cambios ambientales en su camino evolutivo. En cáncer se ha observado que la metilación de numerosos genes supresores de tumores se encuentran alterados, a menudo sobremetilados, bloqueando de esta manera la producción de la proteína. Existen genes que se inactivan o silencian en tumores únicamente por metilación, no por mutación. La epigenética es protagonista de numerosas enfermedades como Síndrome de Rett, Síndrome ICF, de Rubinsteis-Taybi, diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ello, con el tiempo la epigenética se ha convertido en el centro de atención de los investigadores médicos, implicados en el estudio del desarrollo de determinadas enfermedades. Diferentes tipos de cáncer o la hipertensión arterial pulmonar, son algunos ejemplos (3-10).

La importancia de la epigenética cobra vida ya desde el periodo embrionario, en el llamado borrado de impronta. El desarrollo normal de los mamíferos requiere una expresión apropiada de los genes derivados tanto del genoma materno como paterno, siendo expresados, la mayoría, en forma de su origen parental. Sin embargo, un número reducido de ellos (aproximadamente 100 genes) son regulados y transcritos en una manera monoalélica. Para estos genes, denominados improntados (marcados), su patrón de expresión y regulación es dependiente de si su origen es paterno o materno. Por lo tanto, se puede entender que la impronta es un proceso biológico por el cual un gen o dominio genómico se encuentra marcado bioquímicamente indicando su origen parental. Este concepto fue definido por primera vez a mediados de los años ochenta (11).

Desde el descubrimiento de los primeros genes improntados, se han caracterizado al menos unos ochenta más sometidos a este mecanismo.

Ha sido demostrado que el genoma de los óvulos y espermatozoides maduros está altamente metilado, aunque sufre modificaciones importantes poco después de la fecundación. Por lo general, se produce primero una demetilación del genoma paterno de forma activa y posteriormente del materno de forma pasiva. A pesar de estos cambios globales, algunos genes improntados, así como secuencias repetitivas, mantienen su estado de metilación, lo que resulta esencial para el desarrollo embrionario posterior.

En la tercera semana de desarrollo embrionario, se produce la formación de las células germinales primordiales (que darán en un futuro a los óvulos y espermatozoides) y en la novena, se inicia una demetilación de estos genes improntados inicialmente, tanto en hembras como en machos. Transcurrido unos días, prácticamente todo el genoma se encuentra demetilado. Con este mecanismo, se “borra” cualquier modificación epigenética aberrante, previniendo de este modo la herencia de epimutaciones. Una vez se ha producido esta demetilación, estas células entran en secuento meiótico (hembras) o mitótico (machos) y a partir de aquí existen diferentes tiempos de remetilación ya que ocurre tempranamente en los machos, (precediendo a la entrada de las células en mitosis y después en meiosis), mientras que en las hembras se produce después del nacimiento, durante la fase de crecimiento ovocitario. De esta manera quedan reestablecidos nuevamente los patrones de expresión de los genes improntados.

En definitiva, estos genes improntados están implicados en diversos procesos del desarrollo desde la embriogénesis, el crecimiento fetal, diferenciación celular, metabolismo y comportamiento del adulto (12).

Por eso no extraña que se hayan determinado diferentes síndromes asociados a alteraciones en la impronta epigenética, todos ellos con repercusiones fenotípicas serias, como es el caso del síndrome de Angelman, Prader-Willi o Beckwith-Wiedeman.

En relación con esto último se debe mencionar su repercusión en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida (TRAs). En humanos, se han observado anomalías en la metilación del ADN asociadas a estas técnicas, como la inyección intracitoplasmática y fertilización in vitro (FIV). Se ha comprobado que síndromes producidos por alteraciones epigenéticas, como los mencionados anteriormente, los de Beckwith-Wiedemann y Angelman, pueden tener más riesgo de producirse en niños nacidos por FIV, motivación suficiente para exigir alcanzar un mayor conocimiento de las modificaciones epigenéticas y su relación con numerosas enfermedades y disfunciones tras el uso de TRAs. Lo que tendrá además notables consecuencias sobre el manejo, tratamiento y prevención en el futuro de enfermedades en recién nacidos (13).

Por otro lado, recientemente se ha publicado un artículo que ha alcanzado mucha repercusión, en el que se demuestra la comunicación entre la futura madre y su embrión antes de la implantación, a través de la epigenética, aunque el óvulo sea donado (14). En sus conclusiones los autores del estudio afirman que “Hemos podido comprobar que hay un intercambio entre endometrio y embrión, algo que ya sospechábamos por la coincidencia de algunos rasgos físicos entre madres e hijos de ovodonación, así como por la incidencia de enfermedades en los niños, relacionadas con patologías maternas durante la gestación como obesidad o diabetes mellitus de tipo II”.

En el campo de la farmacogenética y farmacogenómica, la epigenética también se encuentra en el punto de mira de los investigadores. Uno de los mayores retos que se han propuesto es la generación de marcadores epigenéticos, que puedan ser validados como marcadores de diagnóstico, pronóstico y terapia, para su aplicación en medicina personalizada. Estos biomarcadores presentan numerosas ventajas. Son analizados fácilmente de forma no invasiva o semi-invasiva (esputo, orina, sangre), presentan gran estabilidad y además revelan información importante sobre la historia de una enfermedad, ya que, al presentar las mismas mutaciones, se pueden identificar los diferentes patrones epigenéticos y con ello establecer un pronóstico de la enfermedad e incluso indicar la necesidad de que el tratamiento sea diferente.

Una de las técnicas más interesantes es la conocida como ChIP-Seq, que se fundamenta en la inmunoprecipitación de la cromatina mediante anticuerpos específicos frente a una histona, y que permite conocer cómo se encuentra metilada la cromatina de un gen que interesa estudiar. Otros métodos pueden detectar mutaciones en enzimas modificadoras como las histonas metiltransferasas o demetilinas, que provocan por ejemplo ganancia o pérdida de función, pudiendo ser también un buen biomarcador para el diagnóstico de enfermedades (por ejemplo, los niveles bajos de lisina metil transferasa han sido relacionados con carcinomas hepatocelulares).

Los patrones aberrantes de metilación o las modificaciones post-traduccionales de histonas en diferentes enfermedades, son modificaciones químicas y no mutaciones de los genes, lo que hace posible emplear fármacos que modulen las enzimas reguladoras de esas modificaciones epigenéticas. Esta es la base de lo que se conoce como terapia epigenética. El ejemplo más destacado es su aplicación en el tratamiento de la Ataxia de Friedreich (15-17). La causa molecular de esta enfermedad es un déficit de una proteína mitocondrial, la frataxina, debido a una mutación en la que se expande un triplete GAA (las repeticiones GAA en individuos sanos son entre 8-33, y en los pacientes con Ataxia de Friedreich pueden llegar a presentar hasta 500 repeticiones (>90)). Como consecuencia, el gen heterocromatiza el promotor del mismo, cerrando la cromatina y por lo tanto, la maquinaria de transcripción no puede actuar, quedando esta anulada. El uso de inhibidores de las histonas desacetiladas, evita que el promotor se compacte y se cierre, por lo que, de nuevo, el gen de la frataxina puede expresarse.

Otro ejemplo interesante sobre la aplicación de la epigenética se encuentra en el Diagnóstico Prenatal No Invasivo. Se trata de una técnica reciente que trata de sustituir a los métodos invasivos, como la amniocentesis y la biopsia corial, que presentan cierto riesgo de aborto involuntario. El descubrimiento de células fetales y de DNA fetal libre en plasma materno, supuso un cambio en la forma de abordar el diagnóstico genético prenatal, permitiendo la obtención de DNA fetal de manera no invasiva y con ello la creación de Test Prenatales No Invasivos (NIPDs). A pesar que los mejores métodos para detectar anomalías cromosómicas con esta técnica es a través de la secuenciación masiva (alcanzándose una sensibilidad de detección para el Síndrome de Down cercana al 99%), la epigenética también es un campo de investigación en este ámbito. La base de su aplicación se encuentra en que existen patrones de metilación diferencial entre madre y feto. Es lo que se denomina Differentially Methylated Regions (o DMR, por sus siglas en inglés). Los estudios se centran en encontrar un biomarcador epigenético para poder diferenciar genes maternos y

fetales (18).

Sobre las aplicaciones clínicas de la epigenética cabe añadir que actualmente, existen en el mercado numerosos Kits de diagnóstico para, por ejemplo, el cáncer colorrectal. La empresa Epigenomics¹³ ha desarrollado uno dedicado a la detección de metilación de Septina 9 (que en este momento se encuentra pendiente de aprobación por FDA). En el cáncer colorrectal es importante el diagnóstico precoz para la supervivencia, por lo que este kit se centra en que en esta enfermedad, se liberan fragmentos de ADN al torrente sanguíneo. La prueba identifica el grado de metilación de estos fragmentos, sobre todo el gen de la septina 9 teniendo un valor pronóstico y diagnóstico, ya que también puede predecir el estadio en el que se encuentra la enfermedad.

Existe la idea de emplear estos marcadores epigenéticos como biomarcadores de pronóstico, diagnóstico y también tratamiento de enfermedades. Se ha publicado un artículo de revisión sobre las características de estos biomarcadores, y cómo se pueden utilizar en diagnóstico como cáncer y enfermedades raras (19). Por todo esto, las investigaciones en este campo cada vez obtienen mayor protagonismo. Una de las últimas en marcha tiene como protagonista los procesos de sepsis o infección severa (20). En estos procesos se produce muerte celular y como consecuencia de ello, se liberan al torrente sanguíneo las histonas, que son tóxicas y producen daños a células endoteliales, generando con ello una gran inflamación. Este proceso contribuye al shock séptico. En estudios preliminares en pacientes con sepsis se podía identificar la histona H3 circulante en plasma. Se está intentando desarrollar un kit para detectar precozmente estas histonas y acelerar así el diagnóstico de sepsis. El proyecto se dirige principalmente, a tratar de reducir la muerte neonatal en países del tercer mundo.

Como curiosidades a incluir para finalizar este apartado, se debe comentar la reciente investigación por la que aparentemente se puede predecir la orientación sexual de un varón a partir de la epigenética. Concretamente tras el estudio de nueve pequeñas regiones. En el ensayo que se cita se estudiaron parejas de gemelos en las que uno de ellos, o los dos, eran homosexuales con este fin (21). También se debe mencionar la posible relación entre envejecimiento y epigenética. Se ha estudiado el epigenoma de personas de 90-100 años, otras en la mitad de su vida y de recién nacidos, observándose que a medida que se envejece, se pierden grupos metilo. Esto implica una expresión inadecuada de genes, como por ejemplo, tipos celulares que empiezan a expresar genes propios de células otros tipos de tejido. Con esto se concluye que el epigenoma proporciona una medida de la edad biológica y puede ayudar a predecir la esperanza de vida. Un ejemplo extremo es el caso de enfermedades de envejecimiento prematuro, como el síndrome de Hutchinson-Gilford o el de Werner, en las que los pacientes que lo presentan, muestran epigenomas propios de edades más avanzadas. Con este conocimiento no es extraño preguntarse si, con los biomarcadores epigenéticos y la búsqueda de genes específicos de la longevidad, ¿llegará un día en el que se puedan obtener medicamentos que alarguen la vida? (22).

Epigenética y Ciencias Forenses

En 2003 los hermanos Sathis y Sabarish Raj, se vieron involucrados en un posible delito de tráfico de droga. Delito que en su país, Malasia, está penado con la muerte. Como es lo habitual ambos negaban su participación en los hechos, sin embargo parece que no cabía duda de que al menos uno de los dos estaba implicado. El problema se planteó en el momento de decidir cuál de ellos porque en ausencia de huellas dactilares, las pruebas de ADN no permitieron diferenciar entre los dos. En consecuencia en el momento de ser juzgados, fueron absueltos ante la incapacidad de determinar al implicado¹⁴.

Casos como el descrito dan a entender la necesidad de encontrar los procedimientos que permitan actuar incluso en esas situaciones tan complicadas.

En 2007 se dio a conocer otro curioso caso en Estados Unidos, cuando la Holly Marie Adams reclamó la paternidad de su hijo a un tal Raymon Miller, junto con la correspondiente pensión de manutención. Aparentemente la resolución del asunto debería ser sencilla, pero todo se enrevesó cuando se dió a conocer que el supuesto padre tenía un hermano gemelo quien además también había mantenido relaciones con la mencionada señora y durante el mismo

¹³ Se puede consultar su página en el enlace siguiente: <http://www.epigenomics.com/en/> (último acceso en octubre de 2015).

¹⁴ Se puede leer la noticia en los enlaces siguientes:
<http://www.levante-emv.com/sucesos/2009/02/08/gemelos-libran-horca-juez-distinguir-culpable/553124.html> (último acceso octubre 2015)
<http://www.alarabiya.net/articles/2009/02/07/65904.html> (último acceso octubre 2015)

periodo. En esta situación la prueba de paternidad se complica hasta el punto de no ser capaz de dar una respuesta aceptable¹⁵.

Algunos años después, a finales de 2012, seis mujeres fueron violadas en Marsella. Los sospechosos eran de nuevo dos gemelos idénticos y una vez más, la ausencia de huellas dactilares llevaba a predecir que no se sabría cuál de ellos había sido el responsable de los hechos. Sin embargo el estudio del ADN había avanzado lo suficiente como para investigar las posibles mutaciones producidas en la molécula e intentar utilizarlas para diferenciarlos.

En ese momento la secuenciación completa permitiría, según se expuso, localizar pequeñas diferencias que serían suficientes para distinguir quién era quién. Fue una empresa dedicada al análisis genético, Eurofins, quien propuso esa posibilidad y la llevó a término. Su trabajo parte de una hipótesis inicial (23) por la que en el caso de gemelos, existen mutaciones raras que se producirían después de la división del blastocisto y que por tanto, sólo afectarían a uno de ellos (24). Para intentar demostrarla se utilizaron las muestras procedentes de una mujer, su hija, el padre de la niña y el hermano gemelo de este último, consiguiendo asignar la paternidad de forma correcta.

Sin embargo y aunque en teoría el problema quedaba resuelto, es necesario recordar la dificultad del trabajo sobre muestras forenses que en muchas ocasiones se encuentran degradadas o contaminadas, lo que impide un examen tan delicado como el que supone una secuenciación completa. Por otra parte, estas mismas circunstancias sustentan el que se debe ser muy precavido a la hora de aceptar como prueba en un juicio los resultados de estos análisis. De hecho en el momento de escribir este texto aún no se sabe si serán o no admitidas en el juicio del conocido como caso McNair, en el que se juzga al acusado por ocho cargos de violación agravada y otros dos de robo a mano armada¹⁶.

Otro inconveniente, secundario, pero que no puede ser obviado, es el coste de la prueba que ronda los ciento sesenta mil dólares¹⁷.

En consecuencia se hace necesario buscar alternativas que proporcionen resultados sobre indicios forenses y que si es posible, resulten menos costosas (en tiempo y económicamente) de realizar. Recientemente los estudios publicados que aplican la epigenética y concretamente el estudio de la metilación del ADN indican que serían buenos candidatos.

En estos ensayos se aplica un procedimiento habitual en los laboratorios de Biología para obtener el patrón de metilación de diferentes regiones del ADN (concretamente Alu- E2F3 y Alu – SP) y los resultados iniciales procedentes de muestras bucales de voluntarios son según los autores del estudio, prometedores. Sin embargo, según ellos mismos advierten, es necesario realizar muchas más experiencias antes de su aplicación en trabajo diario.

Con idéntico objetivo, recientemente se dado a conocer la posibilidad del análisis de la metilación de los LINE-1, como marcador (25).

La resolución del problema de la diferenciación entre gemelos no es la única aportación de los patrones de metilación del ADN a la Ciencia Forense. Desde 2011 se ha apuntado la posibilidad de su contribución en el momento de identificar fluidos biológicos. Esto ha sido posible tras darse a conocer las regiones de los cromosomas denominadas como regiones diferencialmente metiladas específicas de tejido (en adelante tDMRs) que según se ha constatado, presentan perfiles de metilación diferentes dependiendo del tejido o célula de procedencia. En consecuencia, podrían ser utilizadas para averiguar si una mancha sospechosa contiene sangre, saliva, semen...o cualquier otro fluido biológico. En el primer ensayo, publicado en 2011 se seleccionaron cinco tDMRs para los genes DACT1, USP49, HOXA4, PFN3, y PRMT2. Los resultados muestran que los correspondientes a DACT1 y USP49, son específicos para semen. Por otra parte los tDMRs para HOXA4, PFN3, y PRMT2 ofrecen diferentes perfiles de metilación para cada tipo de fluido corporal (26).

Naturalmente y dada la posible naturaleza cambiante de los marcadores epigenéticos, se ha debido realizar las experiencias necesarias, encaminadas a garantizar que los tDMRs seleccionados no son susceptibles de variar en

¹⁵ La noticia en el siguiente enlace:

<http://abcnews.go.com/TheLaw/LegalCenter/daddy-paternity-battle-brothers/story?id=3195632> (último acceso octubre 2015)

¹⁶ Se puede acceder a las noticias sobre el caso en:

<http://www.patriotledger.com/article/20150209/News/150206950> (último acceso octubre 2015) <http://dedham.wickedlocal.com/article/20150228/News/150226509> (último acceso octubre 2015)

¹⁷ Como se expone en la siguiente noticia:

<http://wwlp.com/2015/06/02/more-than-100k-needed-for-test-to-id-identical-twin-rapist/> (último acceso octubre 2015)

respuesta a los factores ambientales y el envejecimiento (27). Posteriormente se ha desarrollado un test multiplex que ofrece la posibilidad de discriminar entre sangre, saliva, semen y fluido vaginal (28).

Después se han ido añadiendo otros posibles marcadores para la identificación de semen, como por ejemplo el gen H19, a partir del patrón de metilación de la región encargada de su control de impresión (29).

Otro asunto que ha estado ocupando a los expertos en Criminalística es conseguir determinar la edad de un individuo a partir del estudio de los patrones de metilación. Se han publicado diferentes estudios que parecen relacionar el proceso de envejecimiento con cambios de metilación en sitios específicos del genoma (30-33), estudiándose además en diferentes tejidos, para comprobar su consistencia (34). Posteriormente se ha aplicado el mismo ensayo sobre manchas de sangre, con el mismo fin, conocer la edad del donante (35,36). Los resultados, según indican los autores, tras analizar seis pares de manchas de sangre frescas y otras que se almacenaron durante cuatro meses en condiciones de laboratorio, confirman que la metilación de ADN es un método fiable y eficaz para la predicción de la edad con fines forenses.

El trabajo sobre manchas de semen con idéntico fin, ha proporcionado también resultados y tal como ha sido publicado los genes TTC7B y NOX4, serían en principio marcadores adecuados para la determinación de la edad (37).

A estos primeros candidatos se han añadido otros, como son ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF14 y FHL2. Según los datos publicados, se logró el cálculo de la edad de los donantes de la necesaria muestra de sangre – comprendidas entre los dos y los setenta y cinco años- con un margen de error de más menos cuatro años y medio (38).

También los loci GRIA2 y NPTX2 se ensayaron para la predicción de la edad, en esta ocasión utilizando tanto muestras de sangre (veintitrés) como de saliva (cuarenta y cuatro) procedentes de voluntarios con edades comprendidas entre 5 y 72 años. En este ensayo el error medio es de más menos nueve con dos años (39).

A continuación, en un trabajo publicado en 2015, se han ampliado las posibilidades del ensayo, proponiéndose que incluso puede llegar a predecirse el tiempo de vida que le queda a una persona. Los investigadores responsables del estudio se dedicaron a comparar las edades reales de cinco mil voluntarios participantes, con la edad que predecía su reloj biológico, encontrándose con que las personas cuya edad biológica era mayor que su edad real tenían más posibilidades de morir antes, que aquellos para los que las edades biológica y real coincidían. Tras dar a conocer sus resultados, se afirma que existe un vínculo entre el reloj biológico y el tiempo de vida. De forma que las medidas de metilación de ADN que indican un envejecimiento acelerado, predicen la mortalidad independientemente del estado de salud, factores de estilo de vida y los factores genéticos conocidos (40).

Pero aún se puede obtener más información, como por ejemplo el sexo del donante del indicio. Son muchos los estudios publicados en este sentido. Los primeros proceden de 1993 y se centraban en el estudio de la metilación de una región específica del cromosoma X, la DXZ4, que se mostraba hipermetilada en los X activos, pero con mínima metilación en los inactivos (41). Después se utilizaron muestras de saliva para intentar localizar otros nuevos marcadores, proponiéndose las regiones tDMR para HOXA4 a tal efecto (26).

Continuando la misma línea de investigación se obtuvieron otros muchos resultados en torno a otras zonas del genoma. La amplia bibliografía al respecto, así lo muestra. Sin embargo también se obtuvieron datos contradictorios que llevan a llamar a la prudencia en el momento de aplicar estas técnicas para la determinación del sexo (42-46).

En otro orden de cosas se ha dado a entender una sorprendente aplicación de los patrones de metilación, relacionada con la posible etiología de la muerte. Se dio a conocer en 2008, tras la publicación de un trabajo en el que se presenta la primera evidencia de la existencia de cambios específicos de la metilación del ADN en determinadas regiones del cerebro de individuos enfermos de depresión y que se quitaron la vida. Según afirman los investigadores responsables, en los casos mencionados han encontrado una tasa de metilación muy superior a la media que inactiva un gen clave para regular la actividad cerebral. Este cambio químico está relacionado con la depresión crónica y apoyaría la hipótesis de una etiología suicida (47).

A todas estas aplicaciones forenses de la huella epigenética (48) queda por añadir una última que puede ser calificada como mínimo de curiosa.

Hace algunos años que se ha reconocido la posibilidad de fabricar ADN artificial que podría ser utilizado con diferentes fines. Algunos encaminados a colaborar con la justicia, como aquellos que se usan para la elaboración de

proyectiles que en lugar de generar una lesión dejan genéticamente marcado a quien los recibe¹⁸. O el sistema oil-tagging, destinado al marcaje de aceites o petróleos para su identificación¹⁹. Por el contrario, otros pueden ser usados para incluir pistas falsas que confundan a los investigadores. Esto es posible si se entiende que estos ADN artificiales pueden mezclarse fácilmente con auténticos tejidos humanos auténticos o ser aplicados sobre superficies u objetos relacionados con un hecho criminal. De hecho incluso se ha comercializado un kit destinado a eliminar cualquier rastro genético de un individuo para sustituirlo por otro²⁰, resguardando de esta forma su privacidad.

Pues bien, una forma de descubrir la presencia de esos ADN intrusos consiste simplemente en determinar la metilación, de la que estos carecen. Sin embargo los autores del artículo donde se propone el ensayo advierten de que este puede no ser eficaz cuando se mezcla un ADN artificial con uno real y este es mayoritario²¹.

A modo de conclusión

La historia de la investigación criminal aporta numerosos ejemplos que demuestran como muchos de los avances de la Biología y la Bioquímica, dirigidos en principio a resolver problemas médicos, acaban por convertirse en herramientas fundamentales para los estudios forenses. Es una constante la adaptación de procedimientos que se consideran habituales en clínica, a los ensayos destinados a resolver los problemas que plantea la Justicia. Lo que incuestionablemente ha contribuido al avance de las Ciencias Forenses. No obstante, muchos de los autores citados en este texto han puesto énfasis en recordar que en este ámbito, las características de las muestras a analizar distan de las que corresponden a las clínicas. Por eso, los métodos que son eficaces cuando se aplican sobre manchas preparadas en laboratorio pueden fracasar estrepitosamente en la práctica. Será necesario entonces no olvidar seguir los protocolos de trabajo más adecuados, teniendo en cuenta siempre que cada muestra es única e imprevisible. Igualmente deberá exigirse la prudencia en el momento de la interpretación de los resultados, con el fin de evitar conclusiones erróneas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Waddington CH. El epigenotype. Endeavour. 1942; 1 : 18-20.
2. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Semin Reprod Med. 2009 Sep;27(5):351-357. doi: 10.1055/s-0029-1237423.
3. Diaw L, Woodson K, Gillespie JW. Prostate cancer epigenetics: a review on gene regulation. Gene Regul Syst Bio. 2007 Dec 11;1:313-325.
4. I Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. LAR J. 2012;53(3-4):359-369. doi: 10.1093/ilar.53.3-4.359.
5. Riedel SS, Neff T, Bernt KM. Histone profiles in cancer. Pharmacol Ther. 2015 Jul 22. pii: S0163-7258(15)00142-4. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.07.004. [
6. Kochan DZ, Kovalchuk O. Circadian disruption and breast cancer: An epigenetic link? Oncotarget. 2015 Jul 10;6(19):16866-16882.
7. Semi K, Yamada Y. iPS cell technology for dissecting the cancer epigenome. Cancer Sci. 2015 Jul 29. doi: 10.1111/cas.12758.
8. Suárez C et al. New advances in genitourinary cancer: evidence gathered in 2014. Cancer Metastasis Rev. 2015 Jul 31.
9. Meloche J et al. Bromodomain Containing Protein-4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. Circ Res. 2015 Jul 29. pii: CIRCRESAHA.115.307004.
10. Kim JD , Lee A , Choi J , Parque Y, Kang H, Chang W, Lee MS , Kim J. Modulación epigenética como un enfoque terapéutico

¹⁸ Se puede leer la noticia en:

<http://news.discovery.com/tech/biotechnology/gun-shoots-dna-bullets-tag-criminals-130129.htm> (último acceso octubre 2015)

Y el acceso a la empresa que los fabrica en:

<https://www.selectadna.co.uk/> (último acceso octubre 2015)

¹⁹ Ver los siguientes enlaces:

<http://www.todoelbarco.com/foro/sistemas-actuales-de-vigilancia-de-vertidos-vt4267.html> (último acceso octubre 2015)

<http://www.todoelbarco.com/foro/sistemas-actuales-de-vigilancia-de-vertidos-vt4267.html> (último acceso octubre 2015)

²⁰ Se puede visitar la página del fabricante en el enlace siguiente:

<http://biogenfutur.es/> (último acceso octubre 2015)

²¹ Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Grafit A. Authentication of forensic DNA samples. Forensic Sci Int Genet. 2010 Feb;4(2):95-103. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.06.009.

- para la hipertensión arterial pulmonar. *Exp. Mol Med* 2015 31 de julio; 47: E175. doi: 10.1038 / emm.2015.45.
11. Barton S., Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 1984;311(5984):374-376.
 12. Reig G, Concha ML. Impronta Genómica y Desarrollo Embrionario. *Int. J. Morphol.* 2012; 30(4):1453-1457.
 13. Bedregal P, Shand B, Santos MJ, Ventura-Juncá P. Aportes de la epigenética en la comprensión del desarrollo del ser humano. *Rev. méd. Chile* 2010;138(3): 366-372. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010000300018>
 14. Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martínez S, Marcilla A, Simón C. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*. 2015 Sep 15;142(18):3210-3221. doi: 10.1242/dev.124289.
 15. Yandim C, Natisvili T, Festenstein R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *J Neurochem*. 2013 Aug;126 Suppl 1:21-42. doi: 10.1111/jnc.12254.
 16. Sandi C, Sandi M, Anjomani Virmouni S, Al-Mahdawi S, Pook MA. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Front Genet*. 2014 Jun 3;5:165. doi: 10.3389/fgene.2014.00165.
 17. Soragni E et al. Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2014 Oct;76(4):489-508. doi: 10.1002/ana.24260.
 18. Papageorgiou EA, Koumbaris G, Kypri E, Hadjidaniel M, Patsalis PC. The Epigenome View: An Effort towards Non-Invasive Prenatal Diagnosis. *Genes (Basel)*. 2014 Apr 9;5(2):310-329. doi: 10.3390/genes5020310.
 19. Sandoval J, Peiró-Chova L, Pallardó FV, García-Giménez JL. Epigenetic biomarkers in laboratory diagnostics: emerging approaches and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Jun;13(5):457-471. doi: 10.1586/erm.13.37.
 20. Ciarlo E, Savva A, Roger T. Epigenetics in sepsis: targeting histone deacetylases. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jun;42 Suppl:S8-12. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.04.004.
 21. Balter M. Can epigenetics explain homosexuality puzzle?. *Science* 2015;350(6257):148. doi: 10.1126/science.350.6257.148
 22. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013 Jun 6; 153(6): 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
 23. Krawczak M, Cooper DN, Fändrich F, Engel W, Schmidtke J. How to distinguish genetically between an alleged father and his monozygotic twin: a thought experiment. *Forensic Sci Int Genet*. 2012 Sep;6(5):e129-30. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.11.003.
 24. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. Finding the needle in the haystack: differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet*. 2014 Mar;9:42-46. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.10.015.
 25. Xu J et al. LINE-1 DNA methylation: A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. *Forensic Sci Int Genet*. 2015 Jul 23;19:136-145. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.07.014.
 26. Lee HY, Park MJ, Choi A, An JH, Yang WI, Shin KJ. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int J Legal Med*. 2012 Jan;126(1):55-62. doi: 10.1007/s00414-011-0569-2.
 27. An JH, Choi A, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. *Int J Legal Med*. 2013 Jan;127(1):35-43. doi: 10.1007/s00414-012-0719-1.
 28. Lee HY, An JH, Jung SE, Oh YN, Lee EY, Choi A, Yang WI, Shin KJ. Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2015 Jul;17:17-24. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.03.002.
 29. Bai L, Yan P, Cao X, Jia L, Zhang C, Guo D. Methylation-sensitive restriction enzyme nested real time PCR, a potential approach for sperm DNA identification. *J Forensic Leg Med*. 2015 Aug;34:34-39. doi: 10.1016/j.jflm.2015.05.001.
 30. Christensen BC et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet*. 2009 Aug;5(8):e1000602. doi: 10.1371/journal.pgen.1000602.
 31. Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD, Wagner W. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*. 2010 Feb;9(1):54-63. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00535.x.
 32. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Predictor epigenética de edad. *PLoS One*. 2011; 6 (6): e14821. doi: 10.1371 / journal.pone.0014821.
 33. Yi SH, Xu LC, Mei K, Yang RZ, Huang DX. Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic

- age-prediction. *Forensic Sci Int Genet.* 2014 Jul;11:117-125. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.03.006.
34. Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany NY).* 2011 Oct;3(10):1018-1027.
 35. Weidner C. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 2014 Feb 3;15(2):R24. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r24.
 36. Huang Y, Yan J, Hou J, Fu X, Li L, Hou Y. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Jul;17:129-136. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.007.
 37. Lee HY, Jung SE, Oh YN, Choi A, Yang WI, Shin KJ. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 May 27;19:28-34. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.014.
 38. Zbieć-Piekarska R. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Jul;17:173-179. doi: 10.1016/j.fsigen.2015.05.001.
 39. Soares Bispo Santos Silva D, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Sampaio Alho C, McCord B. Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging. *Electrophoresis.* 2015 Aug;36(15):1775-1780. doi: 10.1002/elps.201500137.
 40. Marioni RE. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 2015 Jan 30;16:25. doi: 10.1186/s13059-015-0584-6.
 41. Naito E, Dewa K, Yamanouchi H, Takagi S, Kominami R. Sex determination using the hypomethylation of a human macro-satellite DXZ4 in female cells. *Nucleic Acids Res.* 1993 May 25;21(10):2533-4.
 42. Boks MP et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One.* 2009 Aug 26;4(8):e6767. doi: 10.1371/journal.pone.0006767.
 43. El-Maarri O et al. Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males. *Hum Genet.* 2007 Dec;122(5):505-514.
 44. Shen Y et al. X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar 25;105(12):4709-4714. doi: 10.1073/pnas.0712018105.
 45. Zhang FF et al. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics.* 2011 May;6(5):623-629.
 46. Zhu ZZ et al. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol.* 2012 Feb;41(1):126-139. doi: 10.1093/ije/dyq154.
 47. Poulter MO, Du L, Weaver IC, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, Szyf M, Anisman H. GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. *Biol Psychiatry.* 2008 Oct 15;64(8):645-652. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.05.028.
 48. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Sci Int.* 2015 Apr;249:255-265. doi: 10.1016/j.forsciint.2015.01.037.