



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE

“Análisis cuantitativo, de la integridad y posible utilidad para realizar ensayos de análisis de expresión génica del RNA obtenido a partir de muestras de interés forense para la definición del Intervalo *Post Mortem*”

Facultad de Medicina



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Licenciada en Ciencia Forense

**PRESENTA:**

Carina Amalinalli Ruiz Villavicencio

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda



CIENCIA  
FORENSE  
UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria**

A mi madre Carolina, a mi padre José y a mi hermano Ernesto por su apoyo y amor incondicional durante esta y otras etapas de mi vida, sin ustedes nada de esto habría sido posible...

A mis amigos de la licenciatura, principalmente a Yanelly, Idany y Ana, por haber estado conmigo cada vez que lo necesitaba, hicieron de esta travesía algo muy divertido y mucho menos complicado...

Y a todas aquellas personas que directa o indirectamente me proporcionaron las herramientas para culminar esta fase de mi formación académica y que me han abierto las puertas para comenzar otra.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Licenciatura en Ciencia Forense por permitirme formarme como profesional y como persona, a través de la realización de mis estudios en sus instalaciones, con sus recursos y su personal.

Al Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, mi tutor y amigo por abrirme las puertas de su laboratorio, asesorarme durante la realización de este proyecto y apoyar siempre mis ideas, pero sobre todo por confiar en mí y permitirme aprender de él como investigador y persona.

Al laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), por haberme proporcionado los materiales, instalaciones y equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A Alberto Cedro, Fredy Beltrán, Carlos Amado y Marco Fonseca por brindadarme la asesoría, el apoyo y paciencia necesarios para realizar esta investigación.

Al Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) de la Ciudad de México por proporcionar las muestras utilizadas para la elaboración de este trabajo.

A los miembros de mi jurado: la Dra. Claudia Segal, la Dra. Paola de los Heros, el Dr. Mariano Guardado y al Q.F.B. Diego Villanueva por sus valiosas contribuciones para la mejora del presente trabajo.

A mis profesores de la licenciatura, en especial al Dr. Mariano Guardado, la Dra. María Elena Bravo, la Dra. Alexa Villavicencio, la Mtra. Alejandra Quijano, la Dra. Fernanda López y al Dr. Guillermo Romo por haber fomentado mi amor por la genética, la investigación científica y la estadística y haberme permitido aprender tanto de ellos.

A todos mis amigos del laboratorio Luis, la Dra. Silvia, Diego, Mireya, Rocío, Magda, Didier, Gabriela, Diana, Vaitiare, Lizbeth, Marco Mancera, Jazmín, Eduardo y de nuevo a Alberto, Carlos, Fredy y Marco Fonseca por hacer de mis días algo muy divertido y enriquecedor.

A mi profesor de genética el Dr. Jesús Benítez, a quien recuerdo con cariño por haberme escuchado y dado consejos cuando lo necesité.

A mi amiga Angélica Vielma por acompañarme hasta y durante esta etapa de mi vida, siempre motivándome a llegar más lejos.

*... a todos, gracias.*

## Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
Intervalo <i>Post Mortem</i> (IPM) .....	3
Importancia del IPM en una investigación forense .....	3
Métodos convencionales para la estimación del IPM .....	4
- Médico.....	4
- Químico.....	5
- Entomológico .....	7
La Genética Forense: más allá de una forma de identificación humana .....	8
Ácido ribonucleico (RNA) .....	8
Análisis del RNA a través de la Genética Forense: un nuevo enfoque para la estimación del IPM	11
Evaluación del RNA para la estimación del IPM mediante algunas variantes de PCR y electroforesis capilar .....	11
Evaluación del RNA para la estimación del IPM mediante secuenciación masiva .....	15
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>20</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>
Objetivo general .....	21
Objetivos particulares .....	21
<b>Metodología</b> .....	<b>22</b>
Colección de muestras de tejido <i>post mortem</i> .....	22
Criterios de inclusión.....	23
Criterios de exclusión .....	23
Trabajo experimental.....	23
- Extracción del RNA .....	23
- Evaluación de la concentración del RNA total .....	25
- Evaluación de la integridad del RNA total.....	25
- Obtención de cDNA .....	26
- Ensayo de qPCR.....	26
Análisis estadístico .....	27
<b>Resultados</b> .....	<b>28</b>
Evaluación de la concentración del RNA total obtenido de muestras de tejido <i>post mortem</i> .....	28
Evaluación de la integridad del RNA total obtenido de muestras de tejido <i>post mortem</i> .....	30
Evaluación de la amplificación del mRNA de muestras de tejido <i>post mortem</i> .....	35
<b>Discusión</b> .....	<b>40</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>49</b>

**Conclusión ..... 50**  
**Referencias bibliográficas ..... 51**

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Intervalo <i>Post Mortem</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura del RNA.....	9
<b>Figura 3.</b> Estudio realizado por Sampaio et al. (2013).....	12
<b>Figura 4.</b> Estudio realizado por Ferreira et al. (2018).....	15
<b>Figura 5.</b> Requisitos para ser donador de muestra en el <i>GTEX Portal</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> Flujo de trabajo que se sigue para implementar la técnica RNA-seq. ....	18
<b>Figura 7.</b> Distribución de la cantidad de RNA obtenido por tejido.....	29
<b>Figura 8.</b> Electroferogramas de integridad de la muestra de referencia y los controles técnicos.....	30
<b>Figura 9.</b> Electroferogramas de integridad de muestras de tejido adiposo subcutáneo.....	31
<b>Figura 10.</b> Electroferogramas de integridad de muestras de piel.....	31
<b>Figura 11.</b> Electroferogramas de integridad de muestras de pulmón.....	31
<b>Figura 12.</b> Electroferogramas de integridad de muestras de tiroides.....	32
<b>Figura 13.</b> Gel de integridad de muestras de referencia.....	32
<b>Figura 14.</b> Gel de integridad de muestras de tejido <i>post mortem</i> .....	33
<b>Figura 15.</b> Distribución de los valores del RIN obtenido por tejido.....	34
<b>Figura 16.</b> Distribución de los valores del Ct obtenido por tejido y por gen.....	36
<b>Figura 17.</b> Correlación RIN vs Ct por tejido para <i>ACTB</i> .....	38
<b>Figura 18.</b> Correlación RIN vs Ct por tejido para <i>GAPDH</i> .....	39



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Región anatómica y tejidos muestreados .....	22
<b>Tabla 2.</b> Cantidades de tejido <i>post mortem</i> procesadas.....	24
<b>Tabla 3.</b> Cantidades de reactivos empleadas para realizar ensayos de RT-PCR.....	26
<b>Tabla 4.</b> Cantidades de reactivos empleadas para realizar ensayos de qPCR. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones y valores de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 del RNA obtenido a partir de las muestras procesadas.....	28

## Abreviaturas

**A:** Adenina

**ACTB:** Beta Actina

**C:** Citosina

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**Ct:** *Threshold cycle*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**E.U.:** Estados Unidos

**FFPE:** Tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina

**G:** Guanina

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GTEx Portal:** *Genotype Tissue Expression Portal*

**INCIFO:** Instituto de Ciencias Forenses

**IPM:** Intervalo *Post Mortem*

**K<sup>+</sup>:** Potasio

**lncRNA:** Ácido ribonucleico largo no codificante

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**NGS:** Secuenciación de nueva generación

**NIH:** *National Institutes of Health*

**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>:** Grupo fosfato

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNA-seq:** Secuenciación del RNA

**RIN:** Número de integridad del RNA

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosómico

**RT:** Transcripción reversa

**sRNA:** Ácido ribonucleico pequeño

**tRNA:** Ácido ribonucleico de transferencia

**U:** Uracilo

## Resumen

En un contexto forense, cuando se investiga la muerte de un individuo resulta necesario establecer el Intervalo *Post Mortem* (IPM) con el fin de lograr la reconstrucción del hecho. Aunque existen métodos forenses convencionales para la estimación del IPM se considera que éstos son susceptibles de ser complementados con herramientas que permitan realizar una estimación más objetiva y precisa. Con base en ello, desde el campo de la Biología Molecular, la Genética y la Genómica se han desarrollado herramientas que permiten predecir el IPM a través del análisis de la expresión génica mediante el RNA. Por ejemplo, en el estudio de Ferreira et al. (2018), se generó un modelo para la predicción del IPM basado en el análisis de datos de expresión génica obtenidos con secuenciación masiva a partir de muestras de tejido adiposo subcutáneo, pulmón, tiroides y piel colectadas de cadáveres humanos bajo condiciones controladas. Sin embargo, a pesar de que el modelo se propuso como una potencial herramienta de aplicación en el campo forense, hace falta probar si éste en realidad puede ser implementado con muestras obtenidas de un entorno forense real.

Debido a lo antes descrito, el objetivo del presente trabajo, consistió en evaluar la cantidad y el estado de degradación del RNA obtenido a partir de muestras de tejido adiposo subcutáneo, tiroides, pulmón y piel provenientes de cadáveres en un entorno forense. Adicionalmente, se evaluó si era posible amplificar el RNA mediante RT-qPCR y se identificó el tipo de protocolos para análisis de la expresión génica que pueden aplicarse a estas muestras.

Para lograr los objetivos se colectaron muestras de los tejidos antes mencionados a partir de seis cadáveres a los que se les practicó la necropsia en el Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) de la Ciudad de México, muestreando cuatro tejidos por individuo. Posteriormente, se realizó la extracción del RNA con Trizol, seguida de la evaluación de la concentración mediante espectrofotometría y de la integridad con electroforesis capilar. Se realizaron ensayos de RT-qPCR para los genes *ACTB* y *GAPDH*, evaluando la factibilidad de obtener amplicones de las muestras procesadas.

Se concluyó que las cantidades y los valores de integridad del RNA obtenidos de los distintos tejidos procesados son variables y aunque de forma general la integridad es baja en todas las muestras, es factible obtener productos de amplificación de mRNA a partir de ellas, lo que las hace susceptibles de ser analizadas mediante técnicas de análisis de expresión génica como RT-qPCR, secuenciación masiva y microarreglos, siempre y cuando para estos dos últimos se utilicen protocolos especializados en el trabajo con muestras de RNA degradado, tal y como lo son las muestras de tejido embebido en parafina.

## Antecedentes

### Intervalo *Post Mortem* (IPM)

En un contexto forense, cuando se realiza la investigación de un hecho probablemente constitutivo de delito que implica la muerte de una o más personas, algo que debe de realizarse como parte de la investigación es establecer hace cuánto fallecieron esos individuos, es decir, se tiene que establecer el Intervalo *Post Mortem* (IPM) (Teo Chee Hau, 2014).

El IPM es el tiempo transcurrido entre el momento en el que ocurre la muerte de un individuo y el momento en que se le realiza la necropsia, y suele ser estimado por el médico forense como parte de este procedimiento (Li W, 2018). No obstante, puede haber otros profesionales del área forense, tales como químicos o entomólogos, que dependiendo de las características bajo las cuales se desarrolla la investigación, pueden intervenir en esta última realizando la estimación del IPM a través de técnicas o métodos propios de su área de conocimientos (*Figura 1*).



**Figura 1. Intervalo *Post Mortem*.** Representación gráfica del momento en el cual se lleva a cabo la estimación del tiempo de muerte como parte de una investigación forense.

### Importancia del IPM en una investigación forense

La importancia de estimar el IPM como parte de una investigación forense recae en que el conocimiento de este parámetro puede ayudar a las autoridades que investigan el hecho a determinar la credibilidad de las declaraciones arrojadas por los testigos, establecer si los indicios colectados como parte de la investigación tuvieron o no un papel en el hecho que se investiga, determinar la hora aproximada en la cual se llevó a cabo la conducta investigada y ampliar las líneas de investigación en torno a ésta. Juntos, todos estos elementos contribuyen a lograr la reconstrucción del hecho, que es básicamente lo que se busca como parte de la investigación, para que posteriormente jueces en los tribunales puedan determinar la

responsabilidad y de ser necesario, la sanción de los individuos involucrados en el mismo (*Estimation of the Time Since Death*, 2016; Maile, Inoue, Barksdale, & Carter, 2017).

### Métodos convencionales para la estimación del IPM

En el área forense existen algunos métodos convencionales que permiten realizar la estimación del IPM, cada uno implementado desde diversas áreas del conocimiento. Estos métodos son:

#### - Médico

En el abordaje médico legal, el médico forense es quien establece el IPM evaluando los fenómenos cadavéricos, es decir, los cambios que ocurren en el cuerpo tras la muerte de un individuo.

Actualmente se encuentra descrito en la literatura qué fenómenos cadavéricos se presentan, en qué consisten, el orden cronológico en el que aparecen y el IPM en el que se manifiestan. El médico forense estima el IPM contrastando esa información con los fenómenos cadavéricos presentes en el cadáver al momento de realizar la necropsia, basándose principalmente en el momento de aparición de la rigidez (*rigor mortis*), las livideces (*livor mortis*) y la pérdida de la temperatura en el cadáver (*algor mortis*) para establecer el IPM, los cuales son fenómenos cadavéricos que se presentan antes de que comience la putrefacción del cuerpo, con la cual se complica que el médico sea quien lleve a cabo la estimación del tiempo de muerte (Vargas, 2014).

Aunque es útil, la estimación del IPM mediante este enfoque puede verse afectada por diversas variables, entre ellas las condiciones ambientales presentes en el entorno al cual se encontraba expuesto el cuerpo, pues entre mayor sea la diferencia de temperatura entre este último y el ambiente, menor es el tiempo que tardan en aparecer el *algor* y el *rigor mortis* (Teo Chee Hau, 2014). Las características *ante mortem* del individuo, como la edad y la circunferencia de su caja torácica constituyen otra variable que puede influir en la velocidad con la que se presenta la pérdida de temperatura en el cuerpo, pues se ha observado que este fenómeno ocurre más rápido entre menor sea la circunferencia del cadáver y en relación con la edad, se ha observado que en los niños la temperatura desciende más rápido que en los

adultos (Calabuig, 2004; Vargas, 2014). El estado en el que se encontraba el individuo momentos antes de morir también puede afectar la velocidad de aparición de los fenómenos cadavéricos. Condiciones como el golpe de calor, la fiebre, el estrés, el hipertiroidismo, la sepsis, la ingesta de toxinas o drogas, la actividad física *ante mortem* y ciertas causas de muerte como la asfixia, dan lugar a una temperatura anormal inicial más alta que a la que se tendría tras la muerte si no se hubiera presentado ninguna de estas condiciones, lo cual podría hacer creer al médico que el IPM es menor de lo que en realidad es porque la temperatura del cadáver no ha descendido tanto, o por el contrario, si existen condiciones como la hipotermia o las hemorragias que generan que el individuo presente una menor temperatura corporal inicial tras la muerte, el médico podría pensar que el IPM es mayor y por eso el cadáver ha perdido más temperatura (Calabuig, 2004; Vargas, 2014).

Las variables antes mencionadas en la estimación del IPM pueden acelerar o retrasar la aparición de los fenómenos cadavéricos, generando una estimación imprecisa de este parámetro (Chee Hau et al., 2014). Aunado a ello, los IPM establecidos mediante este método suelen ser muy amplios, lo que en ocasiones para fines criminalísticos no resulta tan útil, porque no ayuda a delimitar realmente la hora en la que pudieron haberse llevado a cabo los hechos, esto a su vez, repercute en que sea complicado determinar la responsabilidad de uno o más individuos en el hecho que se investiga considerado como probablemente constitutivo de delito. Otra desventaja, consiste en la subjetividad a la que se encuentra sometida la estimación del IPM bajo este enfoque, pues que se base solamente en la observación del médico sin el manejo de un intervalo de confianza o mediciones cuantitativas, da pie a que el valor de este parámetro dependa mucho de la percepción del profesional que atienda el caso.

#### - Químico

Desde el área de la química, el método que existe para la estimación del IPM consiste en el empleo de modelos matemáticos de regresión lineal basados en el análisis de la concentración de sustancias como el potasio ( $K^+$ ) y/o la hipoxantina presente en humor vítreo. A partir del conocimiento del valor de la concentración de estas sustancias (variable independiente), se puede estimar el valor del IPM (variable dependiente) (Calabuig, 2004).

El humor vítreo es un fluido biológico que se encuentra al interior de la cámara posterior del globo ocular y está constituido por agua, iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y moléculas como glucosa, hipoxantina y proteínas. Por su ubicación, el humor vítreo se encuentra protegido de los procesos de autólisis que se llevan a cabo en otras regiones del cuerpo distintas al globo ocular. Se ha observado que la concentración de sustancias como el  $\text{K}^+$  y la hipoxantina aumenta de forma gradual conforme aumenta el tiempo de muerte (Li W, 2018). El aumento de estas sustancias en el humor vítreo se da como resultado de la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana celular de las células de la retina y la caída en el funcionamiento de la bomba sodio-potasio de las mismas (Brandi C. McCleskey, 2016; Jashnani, Kale, & Rupani, 2010).

Para implementar este abordaje, se toma la muestra de humor vítreo a través de una punción en la esclerótica y la aspiración del mismo, evitando su contaminación con sangre y, en la medida de lo posible, con células de la retina.

Por otra parte, aunque el enfoque químico constituye otra forma de estimar el IPM diferente al abordaje médico, es importante mencionar que la estimación que se hace con el primero también puede ser influenciada por distintas variables, entre las que se encuentra la causa de muerte, pues ha sido reportado que en muertes por causas crónicas la estimación se torna más errática que en muertes por causas agudas, esta discrepancia se cree que se deriva de la ocurrencia de desequilibrios electrolíticos causados por el proceso de la enfermedad crónica. Las condiciones ambientales a las que haya estado expuesto el cadáver también afectan la velocidad con la que aumenta la concentración de  $\text{K}^+$  y/o hipoxantina siendo esta mayor, a mayor temperatura ambiental (Li W, 2018). Asimismo, se ha observado que condiciones *ante mortem* como la edad también tienen un efecto en la estimación del IPM con este método, pues en los niños la concentración de  $\text{K}^+$  e hipoxantina aumenta más rápido que en los adultos. Por último, la manera en la que es colectada la muestra es otro factor que puede alterar las concentraciones de estas sustancias, ya que si no se lleva a cabo de forma adecuada, al momento de realizar la punción podrían arrastrarse muchas células de la retina aumentando con ello las concentraciones de  $\text{K}^+$  en el humor vítreo, haciendo parecer que el IPM es mayor (Baniak N, 2014; Lamont, 2014).



## - Entomológico

La estimación del IPM también puede llevarse a cabo desde la entomología forense, que estudia la sucesión de los insectos que acuden al cadáver atraídos por la materia orgánica en descomposición. Desde el punto de vista entomológico existen dos formas de llevar a cabo la estimación de este parámetro, la primera consiste en el estudio del estadio de desarrollo de los dípteros presentes en el cadáver y la segunda, se basa en el análisis de la cadena trófica que se establece entre las diferentes especies de insectos necrófagos que acuden al mismo. No obstante, existen variables que pueden afectar la estimación del IPM realizada con estos métodos, tales como las condiciones ambientales que pueden favorecer o no la llegada de insectos necrófagos al cadáver; la existencia de micro climas en la región geográfica en donde haya sido localizado el cuerpo que puedan generar que en un mismo espacio exista variabilidad en la manera en la que los insectos se desarrollen y lo colonicen; así como también la existencia de información reportada para una región geográfica específica sobre las especies y el tiempo que tardan en aparecer, pues si no se cuenta con datos reportados para el lugar en el que el entomólogo forense está trabajando, entonces éste no puede proceder a realizar la estimación del IPM. Aunado a ello, es importante mencionar que existe discusión sobre si el estudio de los insectos sirve para estimar realmente un IPM, esto debido a que no es lo mismo el momento en el que un individuo muere, al momento en el que arriban los insectos al cadáver (pues se presume que éstos arriban al cuerpo días después de la muerte), por ende, se ha comenzado a considerar que el dato que el entomólogo proporciona debería de ser más bien considerado como un IPM mínimo, que arroja información sobre hace cuanto llegaron los insectos al cadáver pero no realmente sobre hace cuanto murió el individuo (Rivers & Dahlem, 2014).

Como se mencionó, cada uno de los métodos convencionales para establecer el IPM presenta diversas desventajas y/o limitaciones, es por ello que se considera que son susceptibles de ser complementados con otras herramientas que permitan hacer de la estimación del IPM algo más objetivo y preciso, lo que ha generado que desde otros campos del conocimiento, como la Biología Molecular, la Genómica y la Genética Forense, haya comenzado a estudiarse a los ácidos nucleicos como un nuevo abordaje para la estimación de este parámetro.

## La Genética Forense: más allá de una forma de identificación humana

En el área forense, la Genética ha empleado el análisis del ácido desoxirribonucleico (DNA)<sup>1</sup> como una herramienta para lograr la identificación de individuos dentro de la investigación de diversos hechos controversiales que son de interés para el sistema de impartición de justicia.

Según la revista *Forensic Science International* (2017), la Genética Forense es una rama de la Ciencia Forense que consiste en la aplicación de la Genética para el estudio de muestras biológicas humanas y no humanas con el objetivo de dar solución a conflictos de tipo legal.

Aunque la principal contribución de la Genética Forense en este tipo de investigaciones ha consistido en aportar datos que contribuyan a lograr la identificación de individuos, hoy en día se realizan diversos estudios en esta área del conocimiento con el fin de desarrollar e implementar otras potenciales aplicaciones, entre las que se encuentran la inferencia de rasgos fenotípicos y de ancestría de los individuos probablemente involucrados en el hecho que se investiga a partir del estudio de indicios, la identificación de fluidos biológicos, la identificación de microorganismos utilizados en crímenes biológicos y la estimación del IPM, entre otros (Budowle, Schmedes, & Wendt, 2017; Yang, Xie, & Yan, 2014).

Aunque muchos de estos enfoques todavía siguen en investigación, se espera que en algún momento puedan comenzar a ser aplicados de forma rutinaria como parte de las investigaciones forenses.

### Ácido ribonucleico (RNA)

El ácido ribonucleico (RNA) es una macromolécula compuesta por ribonucleótidos que a su vez, están conformados por una pentosa (ribosa) que tiene unido en la posición 5' un grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y en la posición 1' una base nitrogenada. Para el caso específico del RNA las bases nitrogenadas pueden ser pirimídicas (uracilo "U" o citosina "C") o púricas (guanina "G" o adenina "A") (*Figura 2*). A nivel estructural, el RNA tiene una forma lineal, es de hebra sencilla y puede llegar a adquirir una estructura secundaria de doble hélice debido a la

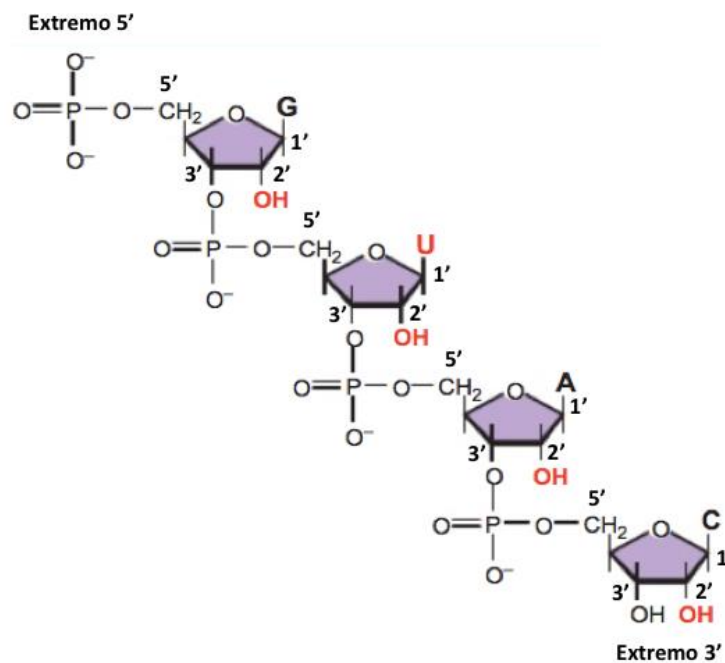
---

<sup>1</sup> **DNA:** biomolécula portadora de la información genética que se encuentra presente en forma de una doble hélice (Kahl, 2015).

complementariedad existente entre las bases nitrogenadas que conforman su secuencia de nucleótidos (Karp, 2014).

Se ha establecido que el RNA es menos estable en comparación con el DNA debido a la presencia del grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa, lo que lo hace más susceptible a la hidrólisis, provocando su degradación (van den Berge, Wiskerke, Gerretsen, Tabak, & Sijen, 2016).

El RNA es considerado como una de las tres principales biomoléculas en cualquier organismo vivo. De acuerdo con el Dogma Central de la Biología Molecular esta molécula funge como intermediaria entre el DNA y las proteínas: a partir del DNA se sintetiza RNA y a partir del RNA se sintetiza una proteína (Crick, 1958).



*Figura 2. Estructura del RNA.* Representación gráfica de la estructura de esta molécula. Tomado y editado de Watson et al. (2014).

Existen distintos tipos de RNA, entre los cuales se encuentran aquellos que participan en la síntesis de proteínas, tales como (Klug, Cummings, Spencer & Palladino, 2013; William, Michael, Charlotte & Michael, 2013):

- **RNA mensajero (mRNA):** conocidos como RNA codificantes porque su secuencia de nucleótidos determina la secuencia de aminoácidos que tendrá la proteína para la cual sirvan

de plantilla. Estas moléculas viajan del núcleo en donde son sintetizados, hasta el citoplasma protegidos de la degradación por una molécula de 7-metilguanosina trifosfato en su extremo 5' y una cola poli-A en el extremo 3'. Ya en el citoplasma se encuentran con los ribosomas que traducen por tripletes de nucleótidos (codones) la secuencia del mRNA a una secuencia de aminoácidos, dando paso a la síntesis de proteínas.

- **RNA de transferencia (tRNA):** estas moléculas de RNA se encargan de transportar hasta el ribosoma los aminoácidos que son necesarios para la síntesis de una proteína. Tienen como parte de su estructura un sitio de unión al aminoácido y un sitio de reconocimiento de codones del mRNA, denominado anticodón.

- **RNA ribosómico (rRNA):** son componentes importantes en la estructura de los ribosomas. Este tipo de RNA presenta una actividad catalítica que contribuye a la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de estructuras proteicas.

Además de participar en la síntesis de proteínas, se ha visto también que existen moléculas de RNA involucradas en la regulación de la expresión génica, tales como (Klug, Cummings, Spencer & Palladino, 2013; William, Michael, Charlotte & Michael, 2013):

- **RNA pequeño (sRNA):** constituidos por una gran variedad de RNAs menores a 200 nucleótidos. Estas moléculas codificadas en el DNA, participan en diversos procesos biológicos dentro de los que se incluyen la degradación de moléculas de mRNA, la inhibición del proceso de traducción, la metilación del DNA y el remodelamiento de la cromatina.

- **RNA largo no codificante (lncRNA):** al igual que los sRNA actúan degradando moléculas de mRNA, inhibiendo el proceso de traducción, promoviendo la metilación del DNA y el remodelado de la cromatina, pero a diferencia de los primeros, los lncRNA tienen una longitud que va de las 200 bases hasta varias kb.

Las moléculas de RNA proporcionan información acerca de la regulación génica. Reflejan qué genes están expresándose de forma activa en un momento determinado, lo cual puede variar dependiendo de los estímulos externos (Fordyce, Kampmann, van Doorn, & Gilbert, 2013). Al conjunto de moléculas de RNA de una célula durante una etapa específica del desarrollo o condición fisiológica se le denomina transcriptoma (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009).

## Análisis del RNA a través de la Genética Forense: un nuevo enfoque para la estimación del IPM

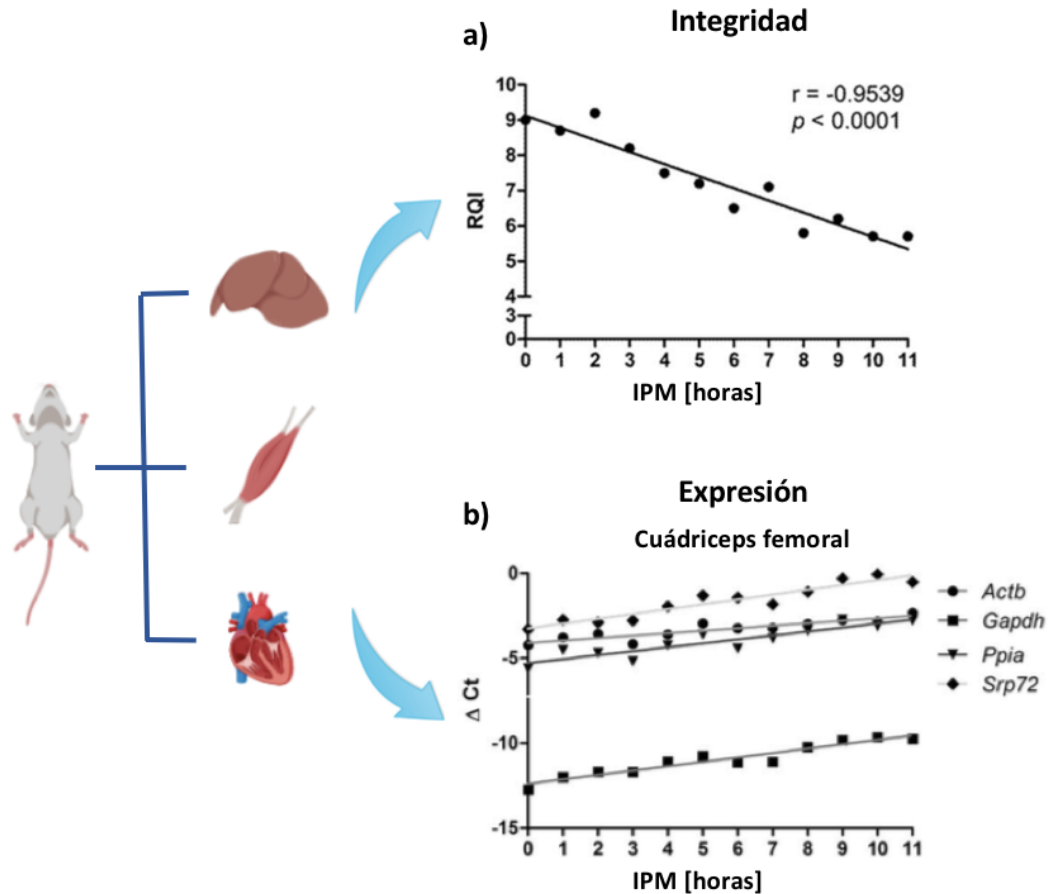
El estudio del RNA ha llamado la atención en la ciencia forense debido a que se ha observado que esta molécula se preserva en tejidos humanos *post mortem* y en fluidos corporales tras la deposición de estos en el lugar de la investigación. Además, su síntesis puede aportar información acerca de los procesos biológicos ocurridos en el cuerpo durante la vida o después de la muerte de un individuo. Diversas investigaciones han explorado las aplicaciones que el análisis de esta molécula puede tener en este campo del conocimiento, entre las que se encuentran la identificación de tipos de fluidos corporales, la estimación del tiempo transcurrido desde el momento en que un indicio biológico es depositado en el lugar de la investigación hasta su hallazgo, la diferenciación de gemelos idénticos y la estimación del IPM, entre otras (Alshehhi & Haddrill, 2019).

En relación con esta última aplicación, se han realizado diversas investigaciones en las que se ha evaluado el papel de esta molécula en la estimación del IPM en dos niveles: el primero consistió en evaluar la integridad del RNA y el segundo, la expresión génica. Con esto, se vislumbró que estos parámetros podrían ser correlacionados con el IPM, dando una estimación de este parámetro mucho más precisa que con los métodos convencionales (Ferreira et al., 2018; Sampaio-Silva, Magalhães, Carvalho, Dinis-Oliveira, & Silvestre, 2013). Para ello, se ha recurrido al empleo de diversas técnicas de biología molecular, tanto básicas como de nueva generación. A continuación, se describirán algunos de los abordajes que se han realizado en torno al tema de la estimación del IPM mediante el análisis del RNA.

### Evaluación del RNA para la estimación del IPM mediante algunas variantes de PCR y electroforesis capilar

Como un ejemplo de las investigaciones realizadas en las que se evalúa el papel del RNA en la estimación del IPM, se tiene el trabajo realizado por Sampaio et al. (2013), quienes trabajaron con muestras de hígado, músculo esquelético y tejido cardíaco de modelos murinos colectadas a diferentes IPM (0 – 11 horas, muestreando cada hora). Inicialmente, este grupo de investigadores evaluó si existía una correlación entre la integridad del RNA obtenido a partir de esos tejidos y el IPM. Para ello, emplearon la técnica de electroforesis capilar y determinaron que a mayor IPM, mayor era el nivel de degradación del RNA total

(Figura 3a). No obstante, también se observó que la degradación de esta molécula se da de forma tejido-específica (Sampaio-Silva et al., 2013).



**Figura 3.** Estudio realizado por Sampaio et al. (2013) en el que se encontró una correlación entre los niveles de degradación del RNA total y los niveles de expresión génica de cuatro genes con el IPM. Estos investigadores analizaron mediante: a) Electroforesis capilar el nivel de degradación del RNA total, encontrando que éste se correlacionaba con el IPM: a mayor IPM, mayor fue la degradación. En la gráfica se observa en el eje “x” el IPM [horas] en el que se colectó la muestra analizada y en el eje “y” el nivel de degradación (RQI, del inglés *RNA quality indicator number*) y; b) qPCR los niveles de expresión de once genes, encontrando que la expresión de sólo cuatro de ellos: *ACTB*, *GAPDH*, *PPIA* y *SRP72* se correlacionaba con el IPM. En la gráfica se observa en el eje “x” el IPM [horas] y en el “y” los niveles de expresión de estos cuatro genes en relación con un gen de referencia. Tomado de Sampaio et. al (2013) y modificado con BioRender: <https://biorender.io>.

Posteriormente, evaluaron la expresión de once genes: cinco utilizados como referencia por su alta estabilidad, cuatro considerados como los más expresados de forma tejido-específica y dos más que se ha observado que son incluso más estables que los comúnmente utilizados como referencia. Esto con el objetivo de establecer un panel de genes cuya expresión pudiera ser estudiada para establecer el IPM. Para ello emplearon la técnica de la

reacción en cadena de la polimerasa transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR, por las siglas en inglés *Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Como resultado, encontraron que la expresión de sólo cuatro de los once genes analizados en muestras de tejido músculo esquelético se correlacionaba directamente con el tiempo de muerte (*Figura 3b*). Con base en sus hallazgos, estos autores desarrollaron un modelo matemático para predecir el IPM a partir del análisis de expresión de los genes *ACTB*, *GAPDH*, *PPIA* y *SRP72* en músculo esquelético, con una media de error de 51.4 minutos. No obstante, no se realizó investigación posterior para validar la utilidad de este modelo en la predicción del IPM con muestras de tejido humano (Sampaio-Silva et al., 2013).

Otro trabajo relacionado con este tema es el reportado por van den Berge et al. (2016), en el que se colectaron 81 muestras de tejido humano: 13 de cerebro, 11 de corazón, diez de riñón, 11 de pulmón, 17 de músculo esquelético, diez de hígado y nueve de piel, todas ellas provenientes de restos exhumados con IPM tardíos (posteriores al inicio de la putrefacción). Como parte del estudio, tras haber realizado la extracción del RNA se implementó una RT-PCR para cada muestra. Posteriormente, se realizó el análisis de la integridad de los productos de amplificación obtenidos utilizando para ello la técnica de electroforesis capilar. Como resultado se obtuvo que el cerebro es el tejido en el que el RNA se mantiene mejor preservado, pues a partir de este tejido se logró obtener perfiles de mRNA del 54% de las muestras procesadas. En segundo lugar se encontró corazón, luego músculo esquelético, riñón, hígado, pulmón y finalmente piel. De acuerdo con este trabajo, no existe una relación clara entre el tiempo de entierro y el éxito en la obtención de perfiles de mRNA a partir de los tejidos muestreados, por lo que sugirieron no relacionar la degradación del RNA con el IPM. No obstante, consideraron que es importante tener en cuenta que existen muchos factores tanto *ante* como *post mortem*, que podrían tener un papel en la degradación de esta molécula, afectando esa relación.

Para el análisis de la integridad del RNA, Sampaio et al. (2013) y van den Berge et al. (2016), emplearon un sistema de electroforesis capilar, la cual es una técnica que permite llevar a cabo la separación de las moléculas contenidas en una muestra según su masa y carga. La técnica consiste en inyectar la muestra a analizar, junto con una solución *buffer* encargada de conducir la corriente eléctrica en los capilares del equipo de electroforesis capilar. El *buffer* funge como conductor de la electricidad, lo cual ayuda a conformar el campo eléctrico

a través del cual las moléculas de RNA de la muestra analizada migran hacia el polo positivo. En este caso, los fragmentos de RNA son separados de acuerdo a su masa: a menor masa molecular, la migración es más rápida, a mayor masa, las moléculas migran más lento. La separación de los fragmentos puede visualizarse debido a que como parte del procedimiento la muestra es marcada fluorescentemente de forma previa a su inyección en los capilares y conforme los fragmentos de RNA van migrando a través de éstos, llegan a un punto en el cual son incididos por un láser que los excita provocando que emitan fluorescencia, siendo esta la manera en la que son detectadas por el equipo (Keith, 2010; *Tag-based Next Generation Sequencing*, 2012).

Aunado a ello, para llevar a cabo su investigación Berge et al. (2013) utilizaron la técnica RT-PCR que permite la amplificación de un segmento de DNA complementario<sup>2</sup> (cDNA) a partir de un templado de RNA con acción de la enzima transcriptasa reversa, mientras que Sampaio et al. (2013) emplearon la RT acoplada a una qPCR que es una variante de la PCR.

La PCR es una técnica básica de biología molecular que permite la obtención de miles de copias de un segmento de DNA a través de varios ciclos de amplificación, los cuales a su vez, se encuentran divididos en tres etapas distintas: desnaturalización, alineamiento y extensión. En estas etapas a través de las variaciones en la temperatura de la reacción se logra la amplificación exponencial del segmento de DNA de interés. Los componentes esenciales que se emplean para esta técnica son una enzima DNA polimerasa termoestable, un par de oligonucleótidos sintéticos, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), cationes divalentes (MgCl<sub>2</sub>), *buffer* y moléculas de DNA blanco (templado) (Karp, 2014).

De forma específica, en la PCR convencional (denominada como punto final) los productos de amplificación se cuantifican hasta el término del ensayo, mientras que en la qPCR se detectan y cuantifican a lo largo de la reacción (Kahl, 2015). La RT-qPCR es útil cuando se quiere evaluar los niveles de expresión de uno o algunos genes, para lo cual es necesario primero realizar una RT que permita la conversión de moléculas de RNA a cDNA y posteriormente, una qPCR a partir de ese cDNA para medir los niveles de expresión.

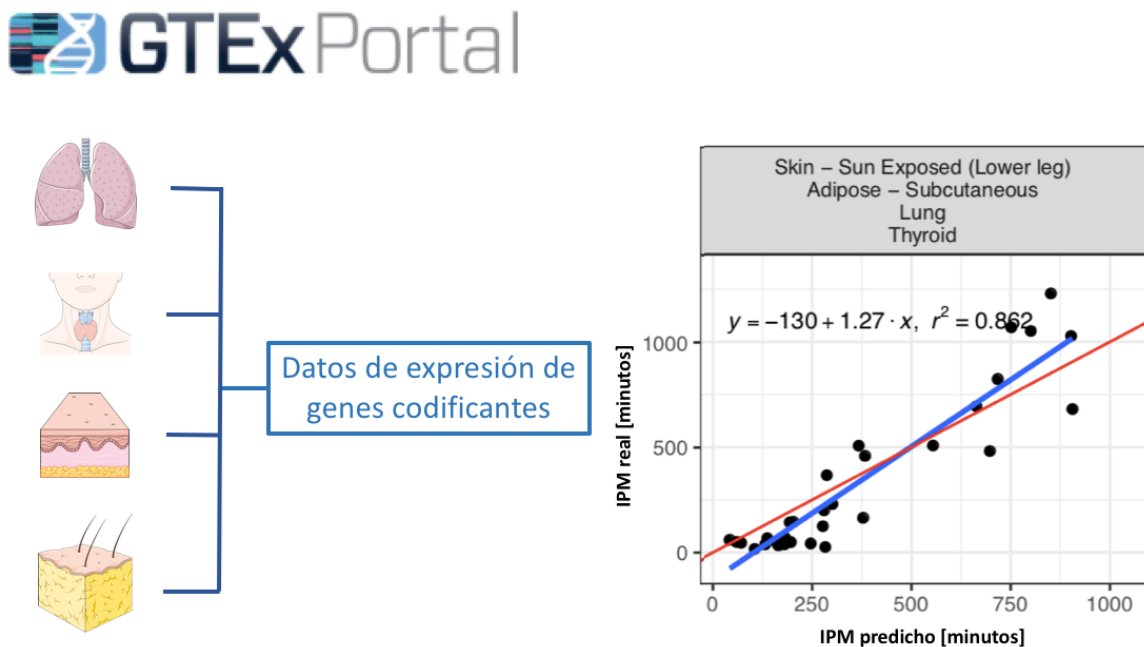
---

<sup>2</sup> **cDNA:** molécula de DNA de cadena simple o doble complementaria a un templado de RNA, usualmente mRNA, copiada con ayuda de una polimerasa dependiente de RNA (Kahl, 2015).



## Evaluación del RNA para la estimación del IPM mediante secuenciación masiva

Además del empleo de técnicas como la RT-qPCR, la RT-PCR y la electroforesis capilar, otro enfoque que se ha desarrollado para evaluar la expresión génica y su papel en el establecimiento del IPM, consiste en la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva, tal como se reporta en el trabajo desarrollado por Ferreira et al. (2018), en el cual se observó que los cambios en los niveles de expresión de genes codificantes de muestras de pulmón, tiroides, piel y tejido adiposo subcutáneo se correlacionan con el IPM. Con base en ello, estos autores establecieron un modelo para predecir el tiempo de muerte basado en el análisis de datos globales de expresión génica generados con secuenciación masiva del RNA (RNA-seq, del inglés *RNA-sequencing*) a partir de los cuatro tejidos ya mencionados (*Figura 4*) (Ferreira et al., 2018).



**Figura 4.** Estudio realizado por Ferreira et al. (2018) en donde se propuso que el análisis de los cambios en los niveles de expresión de cuatro tejidos puede ser útil para estimar el IPM. Estos investigadores analizaron datos de expresión génica generados con RNA-seq a partir de diferentes tejidos humanos y encontraron que los datos de tiroides, pulmón, tejido adiposo subcutáneo y piel podrían ser útiles para estimar el tiempo de muerte. En la gráfica en el eje “x” se observa el valor del IPM predicho con el modelo generado por estos autores, mientras que en el eje “y” se observa el valor del IPM real de los individuos cuyos datos de expresión fueron considerados en el estudio. Tomado de Ferreira et al. (2018) y modificado con Smart Servier Medical Art: <https://smart.servier.com>.

Adicionalmente, como parte de su estudio estos investigadores observaron que el valor de la predicción del IPM generado con el modelo no se veía afectado por la causa de muerte, por lo que propusieron que éste puede fungir como una potencial herramienta para la estimación del tiempo de muerte en el campo forense (Ferreira et al., 2018).

Este grupo de investigación utilizó datos de expresión génica contenidos en el *GTEX Portal* (del inglés *Genotype-Tissue Expression Portal*) para desarrollar su modelo de predicción del IPM, el cual se trata de una base de datos generada como parte de un proyecto liderado por los Institutos Nacionales de Salud en Estados Unidos (NIH, del inglés *National Institutes of Health*), que tiene como objetivo evaluar la relación entre la variación génica y la expresión génica en tejidos humanos sanos y, con ello, comprender cómo esta relación contribuye a la susceptibilidad a desarrollar alguna enfermedad. Las muestras recolectadas y consideradas para la construcción de esta base de datos provienen de diversos tejidos del cuerpo humano, a los cuales no se puede tener acceso a partir de individuos vivos por lo invasivo que esto resultaría, por lo que se obtienen a partir de cadáveres. Las muestras son recolectadas en instituciones hospitalarias de Estados Unidos (E.U.) con ayuda de organizaciones encargadas de gestionar el trasplante de órganos en los institutos de salud de ese país y los donadores tienen que cumplir con una serie de requisitos para poder ser considerados como incluidos en el proyecto (*Figura 5*) (Carithers et al., 2015; Carithers & Moore, 2015; Consortium, 2017).

Una vez ocurrida la muerte de los individuos seleccionados como donadores, los tejidos son colocados en una solución fijadora dentro de las primeras 8 horas posteriores al cese cardíaco (Institute, s.f.). Tras la colección y como parte del procesamiento de la muestra, se realiza un estudio histopatológico con el cual se comprueba el origen del tejido, la integridad del mismo y el estado de salud, pues éste no debe de presentar signos de padecer enfermedades inflamatorias, infecciosas o cáncer. Adicionalmente, como último filtro de selección, las muestras tienen que presentar una cantidad total de al menos 500 ng de RNA, el cual debe de tener un valor de integridad (RIN,<sup>3</sup> de las siglas en inglés *RNA Integrity*

---

<sup>3</sup> **RIN:** medida de la integridad del RNA total basada en la comparación de la elución o los perfiles electroforéticos de la muestra de interés vs un RNA de referencia después de su separación en un equipo de electroforesis capilar. El RIN puede tomar un valor de 1 a 10, donde 1 corresponde a un RNA extremadamente degradado y 10 a un RNA altamente íntegro (Kahl, 2015).

*Number*) medido por electroforesis capilar, mínimo de 5.7 (Carithers et al., 2015; Carithers & Moore, 2015; Consortium, 2017).

- ¿Quién es elegible?**
1. Donadores de 21 a 70 años de edad.
  2. Donadores con índice de masa corporal entre 18.5 y 35.
  3. Donadores con los cuales sea probable realizar la colección de tejidos dentro de las 24 horas posteriores al cese de la actividad cardiaca.
  4. Donadores que no recibieron transfusión sanguínea en las 48 horas previas.
  5. Donadores que nunca han sido diagnosticados con cáncer metastásico.
  6. Donadores que no han recibido quimioterapia o radioterapia para el tratamiento de cáncer o de cualquier otra condición al menos dos años atrás.
  7. Donadores que no cuenten con un historial de abuso de drogas vía intravenosa al menos cinco años atrás.
  8. Donadores que no hayan mantenido relaciones sexuales con alguien diagnosticado con VIH/SIDA, y/o hepatitis C, y/o hepatitis B o alguien que haya abusado de drogas vía intravenosa al menos cinco años atrás.
  9. Donadores que no hayan estado expuestos a VIH/SIDA, y/o hepatitis C, y/o hepatitis B a través de pinchazos de aguja o heridas abiertas.
  10. Donadores que no tengan antecedentes de haberse practicado ensayos de detección reactivos para VIH-1 o VIH-2, independientemente de los resultados de los ensayos complementarios.

**Figura 5. Requisitos para ser donador de muestra en el *GTEx Portal*.** Se muestran los criterios establecidos para la selección de donadores de muestras cuyos datos de expresión se incluyen en esa base de datos. Tomado y modificado de Carithers et al. (2015).

Como se mencionó anteriormente, los datos de expresión con los cuales fue construido el modelo de Ferreira et al. (2018) fueron generados mediante secuenciación masiva, también llamada secuenciación de nueva generación (NGS, de las siglas en inglés *Next Generation Sequencing*), que es una tecnología de análisis genómico global, a través de la cual es posible conocer la secuencia de millones de fragmentos de DNA o RNA en distintas muestras de manera simultánea. Aunque esta técnica tiene distintas variantes (illumina, 2016), Ferreira et al. (2018), se centraron en implementar el análisis de datos de una variante específica denominada RNA-seq.

Actualmente, existen diversas compañías que han desarrollado sus propias plataformas para la secuenciación del RNA, y aunque si bien la química de la reacción puede variar entre ellas, el flujo de trabajo para secuenciar esta molécula es semejante. La preparación de la muestra consiste en llevar a cabo la extracción de RNA total, seguida de la purificación de los mRNA a través de su enriquecimiento selectivo mediante las colas de poli-A o la depleción de los rRNA. Una vez purificadas las moléculas de mRNA, se procede a realizar

la preparación de la biblioteca genómica fragmentándolas y sintetizando a partir de ellas cDNA de doble cadena (ds cDNA, del inglés *double-stranded* cDNA), al cual se añaden secuencias adaptadoras (oligonucleótidos) en sus extremos, que permiten posteriormente amplificar esos fragmentos de DNA (amplificación clonal) y finalmente secuenciarlos. Por último, los datos obtenidos son procesados con ayuda de distintas herramientas bioinformáticas (Figura 6) (illumina, 2016b; Wang et al., 2009).

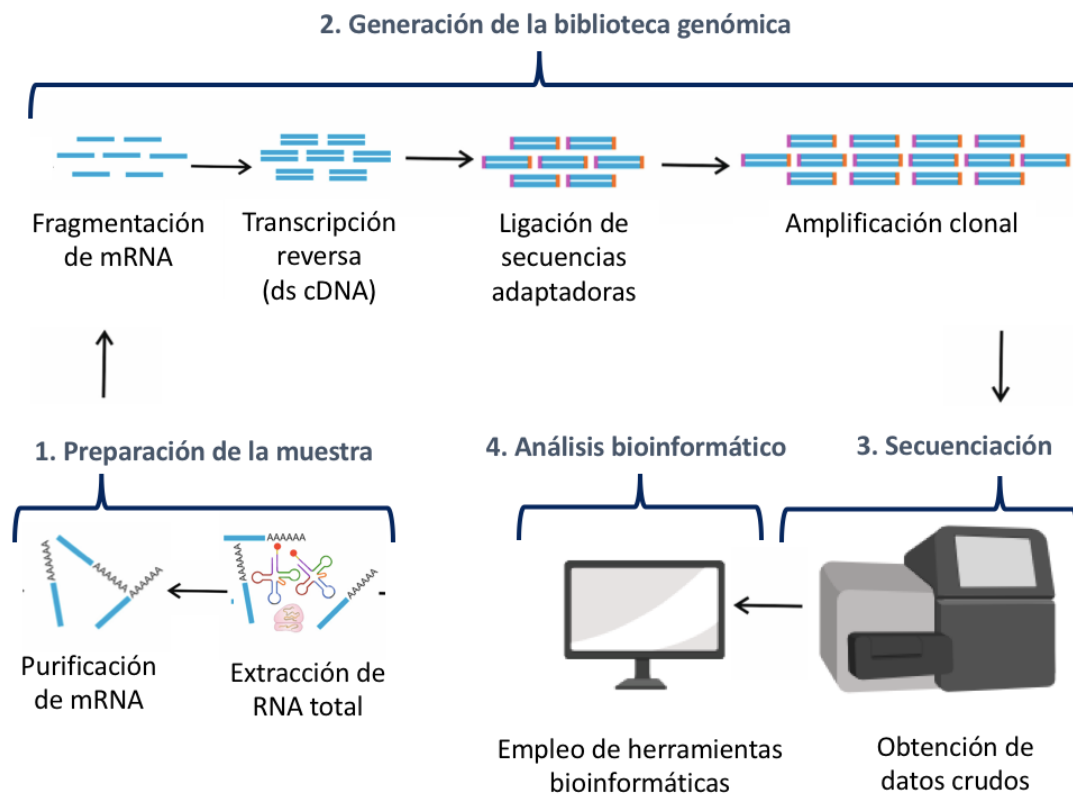


Figura 6. Flujo de trabajo que se sigue para implementar la técnica RNA-seq. Elaborado con BioRender: <https://biorender.io>.

Con base en lo antes mencionado, si bien es evidente que existen diversas investigaciones en las que se ha evaluado si el estudio del RNA podría ser utilizado como un parámetro para establecer el IPM, ya sea a nivel de integridad o a nivel de expresión génica, lo cierto es que muchas de ellas se llevaron a cabo bajo condiciones controladas (M. Bauer, 2007; Martin Bauer, Gramlich, Polzin, & Patzelt, 2003; Fordyce et al., 2013), lo cual no es la realidad de un entorno forense en el que los indicios a partir de los cuales se muestrea pueden encontrarse en poca cantidad, degradados, contaminados y/o expuestos a condiciones no sólo no controladas, sino incluso desconocidas.

Aunque Ferreira et al. (2018), propusieron un modelo para predecir el IPM basado en el análisis de datos de expresión génica generados con la técnica RNA-seq a partir de muestras de pulmón, tiroides, piel y tejido adiposo de individuos humanos bajo condiciones controladas (lo que permitió obtener ácidos nucleicos de alta calidad), resulta necesario evaluar si el modelo propuesto por estos autores sería aplicable en el campo forense a través del análisis de muestras de tejido expuestas a condiciones no controladas propias de este tipo de investigaciones, y si los ácidos nucleicos (RNA) extraídos a partir de esas muestras cumplen con los estándares necesarios de concentración e integridad para poder llevar a cabo ensayos de análisis global de la expresión (Ferreira et al., 2018).

Debido a lo antes descrito, el objetivo del presente trabajo aborda la primera parte de esta pregunta, enfocada en evaluar la cantidad y calidad del RNA obtenido a partir de muestras de tejido adiposo subcutáneo, tiroides, piel y pulmón, que fueron colectados de cadáveres a los que se les practicó la necropsia en el Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO). Esto, a su vez, permitirá determinar la factibilidad de utilizar el RNA obtenido de muestras forenses reales en un futuro, como material para establecer el IPM a través del uso de herramientas de análisis molecular.

## Planteamiento del problema

En un contexto forense, cuando se investiga un hecho que implica la muerte de uno o más individuos resulta necesario establecer el Intervalo *Post Mortem* (IPM) con el fin de lograr la reconstrucción del hecho. Aunque existen distintos métodos forenses convencionales para ello, tales como la observación de los fenómenos cadavéricos, el análisis de la concentración de potasio y/o hipoxantina en el humor vítreo y el estudio de la sucesión de insectos que acuden al cadáver, éstos se ven afectados por diversas variables, entre ellas la causa de muerte, las condiciones ambientales, el estado *ante mortem* del individuo, entre otras, siendo esta la razón por la cual desde la Genética Forense se ha comenzado a tratar de implementar otros métodos con los cuales pueda estimarse este parámetro de forma más precisa y complementaria a los métodos convencionales, siendo el estudio del RNA una opción.

Existen investigaciones en las que se evalúa el papel del análisis del RNA en la estimación del IPM. No obstante, muchas se llevaron a cabo bajo condiciones controladas, entre ellas la realizada por Ferreira et al. (2018), en donde trabajando con datos de muestras de tejido humano propusieron un modelo para la predicción del IPM basado en el análisis de datos de expresión génica generados con secuenciación masiva del RNA, a partir de muestras de pulmón, tejido adiposo subcutáneo, tiroides y piel. Aunque el modelo se ha propuesto como una herramienta de potencial aplicación en el campo forense, lo cierto es que no ha sido probado con muestras propias de este tipo de investigaciones que pudieran encontrarse degradadas, en poca cantidad y expuestas a condiciones no controladas o incluso, desconocidas. Por otra parte, aunque van Berge et al. (2016) evaluaron la factibilidad de obtener RNA de muestras de tejido forenses, no hicieron una descripción minuciosa de características como la cantidad e integridad del RNA obtenido a partir de ellas. Es por ello que resulta necesario evaluar si el RNA obtenido a partir de muestras de interés forense reales, cumple con las características como cantidad, calidad e integridad, necesarias para llevar a cabo ensayos moleculares para análisis de la expresión génica, tales como los que requiere el modelo de Ferreira et al. (2018) para ser implementado.

## Objetivos

### Objetivo general

Analizar la cantidad, integridad y posible utilidad para realizar ensayos de análisis de expresión génica del RNA obtenido a partir de muestras de interés forense (tejido adiposo subcutáneo, pulmón, tiroides y piel) provenientes de cadáveres a los que se les practicó la necropsia en el Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO).

### Objetivos particulares

- 1) Cuantificar por medio de espectrofotometría la concentración del RNA total de muestras de pulmón, tiroides, tejido adiposo subcutáneo y piel de cadáveres a los que se les realizó la necropsia en el INCIFO.
- 2) Determinar mediante la técnica de electroforesis capilar el valor de integridad del RNA total de cada muestra procesada.
- 3) Evaluar a través de la técnica de RT-PCR en tiempo real con sondas Taq-Man la amplificación del RNA mensajero de los genes *ACTB* y *GAPDH* obtenido de las muestras procesadas.
- 4) Identificar con base en la cantidad y los valores de integridad del RNA total obtenido, el tipo de protocolos moleculares para el análisis de la expresión génica que pueden implementarse para el estudio de muestras de tejido *post mortem* obtenidas en un contexto forense.

## Metodología

### Colección de muestras de tejido *post mortem*

Durante la realización de la necropsia se colectaron muestras de tejido humano a partir de seis cadáveres a los que se les practicó este procedimiento en el INCIFO. De cada cadáver se colectó una muestra de tiroides, una de pulmón, una de tejido adiposo subcutáneo y una de piel.<sup>4</sup> Las muestras fueron depositadas en microtubos de 0.6 mL que contenían el reactivo *Allprotect Tissue Reagent* (QIAGEN) que detiene los cambios en la integridad y en la expresión génica, este reactivo cubría por completo el tejido. En total, se colectaron 24 muestras: seis de tiroides, seis de tejido adiposo subcutáneo, seis de piel y seis de pulmón, todas ellas pertenecientes a seis individuos distintos.

Para llevar a cabo la recolección de muestras se contó con ayuda del personal del INCIFO y el protocolo de trabajo aprobado por el Comité de Ética del mismo Instituto.

Las regiones anatómicas a partir de las cuales se muestreó fueron las siguientes (*Tabla 1*):

**Tabla 1. Región anatómica y tejidos muestreados.** Descripción del lugar anatómico a partir del cual se colectaron las muestras de tejido de los cadáveres a los que se les practicó la necropsia en el INCIFO.

Tejido	Adiposo subcutáneo	Pulmón	Tiroides	Piel
Región anatómica muestreada	Región abdominal	Segmento inferior del lóbulo superior izquierdo, aproximadamente a 1 cm por debajo de la superficie pleural	Regiones no nodulares	Región adyacente a la incisión que se realiza como parte del procedimiento de necropsia a la altura del cuello

Es importante mencionar que se determinó qué región anatómica muestrear considerando los tejidos en los que se basa el modelo propuesto por Ferreira et al. (2018) y lo reportado en la base de datos del *GTEx Portal* en relación con las especificaciones sobre la región

---

<sup>4</sup> Así como en el estudio desarrollado por Ferreira et al. (2018), para el presente estudio las muestras de piel analizadas provienen de regiones anatómicas que durante la vida de un individuo suelen encontrarse expuestas al sol; en este caso el cuello.



anat6mica, a partir de la cual se obtuvieron muestras de esos tejidos como parte de la realizaci3n de ese proyecto (GTEEx Portal, 2019).

### Criterios de inclusi3n

Se colectaron muestras de pulm3n, tiroides, tejido adiposo subcut3neo y piel de individuos a los que se les practic3 la necropsia en el INCIFO y que contaban con una edad de entre 18 y 70 a1os.

### Criterios de exclusi3n

No se muestrearon a individuos a los que ya se les haba realizado el procedimiento de necropsia de forma previa al momento del muestreo, ni a aquellos que ya contaban con signos de putrefacci3n, as3 como tampoco a aquellos de los cuales no se pod3an colectar los cuatro tejidos necesarios para el estudio.

### Trabajo experimental

#### - Extracci3n del RNA

Se llev3 a cabo la extracci3n del RNA de 24 muestras de tejido *post mortem* y adicionalmente, de una muestra de la l3nea celular MDA-MB-468, que se caracteriza por tratarse de c3lulas tumorales de c3ncer de mama, y de una biopsia de tejido fresco tumoral mamario siguiendo el protocolo TRIZol<sup>TM</sup> *Reagent User Guide* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). En este caso, estas 3ltimas dos muestras fungieron como controles t3cnicos de calidad, en donde es necesario mencionar que lo que las hac3a relevantes para el presente estudio no era el tipo celular, sino el hecho de que se encontraran siempre almacenadas y procesadas bajo condiciones caracter3sticas de un laboratorio, es decir, bajo condiciones controladas en comparaci3n con las muestras de tejido *post mortem* a procesar, provenientes de un entorno forense real con condiciones no controladas.

- 1) De las muestras de tejido se pes3 la siguiente cantidad (*Tabla 2*):

**Tabla 2. Cantidades de tejido *post mortem* procesadas.** Se muestra en mg la cantidad que se pesó de cada muestra de tejido *post mortem* para con base en ello proceder a realizar los siguientes pasos en la extracción de RNA total.

Tejido	Adiposo subcutáneo						Piel					
Individuo	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>Peso [mg]</b>	93.0	100.0	50.0	95.1	92.2	50.0	85.1	50.0	93.2	51.1	20.0	79.1
Tejido	Pulmón						Tiroides					
Individuo	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>Peso [mg]</b>	90.0	90.0	88.1	100.0	98.1	65.1	87.5	90.0	91.1	87.0	100.2	86.3

En relación con la línea celular se partió de una cantidad de  $1 \times 10^6$  células y de la muestra de tumor se pesaron 50 mg.

- 2) Se añadió 1 mL de Trizol a cada muestra por cada 50 – 100 mg de tejido y se homogenizó de forma mecánica con ayuda de un homogenizador de tejido (*Tissue Ruptor*). A la muestra de la línea celular se le agregó 1 mL de Trizol y no hubo necesidad de homogenizar.

*A la muestra de piel número 5, se agregaron sólo 500 µL de Trizol, ajustando de este paso en adelante las cantidades de reactivo adicionadas a la mitad, dado que para esta muestra se contaba con menos de los 50 mg de tejido recomendados por el protocolo.*

- 3) En el caso de las muestras de tejido adiposo subcutáneo, debido a su alto contenido en grasa, se centrifugó el lisado durante 5 minutos a 12,000 rpm a una temperatura de 4 °C.
- 4) Las muestras se incubaron por 5 minutos en hielo.
- 5) Se añadieron 0.2 mL de cloroformo a las muestras y posteriormente se agitaron manualmente.
- 6) Las muestras fueron incubadas por 3 minutos en hielo.
- 7) Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12,000 rpm a una temperatura de 4 °C.

*Tras llevar a cabo este paso, se dio la separación de tres fases: la fase orgánica en el fondo del tubo, la interfase y la fase acuosa, que contenía el RNA.*

- 8) Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo, desechando el resto de las fases.

- 9) Se añadieron 0.5 mL de isopropanol a la fase acuosa por cada 1 mL de Trizol empleado para llevar a cabo la lisis celular.
- 10) Las muestras se incubaron por 10 minutos en hielo.
- 11) Se procedió a centrifugar las muestras por 10 minutos a 12,000 rpm a una temperatura de 4 °C.

*Como resultado de este paso se dio la formación de una pastilla en el fondo del tubo.*

- 12) Se descartó el sobrenadante por decantación.
- 13) Se resuspendió la pastilla añadiendo 1 mL de etanol al 75 % por cada 1 mL de Trizol utilizado para la lisis.
- 14) Las muestras fueron agitadas con ayuda de un *Vortex* y posteriormente centrifugadas a 7,500 rpm a una temperatura de 4 °C por 5 minutos.
- 15) El sobrenadante se descartó con ayuda de una micropipeta.
- 16) Se repitieron los pasos 14 y 15, nuevamente.
- 17) La pastilla se dejó secar por 15 minutos manteniendo el microtubo abierto ventilándose en hielo.
- 18) Se agregaron 50 µL de agua libre de RNAsas grado biología molecular para resuspender la pastilla.

*La muestra de piel número 5 se resuspendió en 30 µL de agua grado biología molecular.*

#### - Evaluación de la concentración del RNA total

Se cuantificó la concentración del RNA total empleando el equipo de espectrofotometría *NanoDrop One* (Thermo Scientific). Para ello de forma previa a la cuantificación, las muestras fueron agitadas en el *Vortex* por 15 segundos y posteriormente, centrifugadas en la microcentrífuga *Sprout* por 10 segundos. Para calibrar el equipo se utilizaron 1.5 µL de agua grado biología molecular como blanco y 1.5 µL de cada muestra para evaluar la concentración.

#### - Evaluación de la integridad del RNA total

La integridad del RNA de las muestras procesadas fue evaluada en la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), mediante la técnica de electroforesis capilar. Para ello se empleó la plataforma *Eukaryote Total RNA*

*Nano*, versión 2.6, en la cual fueron cargadas las 26 muestras de RNA a analizar junto con un marcador de peso molecular para luego correr el chip en el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies).

La integridad fue expresada como el número de integridad del RNA (RIN), que se basa en el cálculo de la relación del área bajo la curva detectada entre los picos del electroferograma generados por las dos bandas mayoritarias del RNA ribosomal (18S y 28S). El RIN puede tomar valores de entre 1 y 10, en donde 1 equivale a un RNA altamente degradado y 10 a una muestra completamente íntegra (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016).

#### - Obtención de cDNA

Para realizar la transcripción reversa se llevó a cabo un ensayo de RT para cada muestra, según lo establecido en el protocolo *SuperScript III RT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando el equipo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Para ello, se partió de 100 ng de RNA total, adicionándoles 10  $\mu$ L de Mix para RT-PCR preparado de acuerdo a las siguientes cantidades de cada reactivo (*Tabla 3*):

**Tabla 3. Mix de reacción RT-PCR.** Las cantidades de reactivos empleados para preparar el mix de reacción se muestran en  $\mu$ L.

Reactivo	Volúmen por reacción ( $\mu$ L)
RT Buffer	2.0
dNTP mix (100 mM)	0.8
Transcriptasa Reversa	1.0
Primers <i>random</i> para RT	2.0
Agua libre de nucleasas	4.2
<b>Total por reacción</b>	<b>10.0</b>

#### - Ensayo de qPCR

Se realizaron ensayos de qPCR por triplicado para cada muestra con el fin de evaluar la factibilidad de conseguir productos de amplificación a partir de éstas. Para ello, se utilizó el

equipo para PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems) y se evaluaron los amplicones de los genes de expresión constitutiva *ACTB*<sup>5</sup> (Hs99999903) y *GAPDH*<sup>6</sup> (Hs02786624), partiendo de 1  $\mu\text{L}$  de cDNA y 9  $\mu\text{L}$  de *mix* preparado de acuerdo a las siguientes cantidades de cada reactivo (*Tabla 4*):

**Tabla 4. Mix de reacción qPCR.** Las cantidades de reactivos para preparar el mix de reacción se muestran en  $\mu\text{L}$ .

Reactivo	Volúmen por reacción ( $\mu\text{L}$ )
Master mix universal TaqMan	5.0
Sonda Taqman	0.5
Agua libre de nucleasas	3.5
cDNA	1.0
<b>Total por reacción</b>	<b>10.0</b>

El equipo de qPCR se programó para llevar a cabo un total de 45 ciclos de reacción.

#### Análisis estadístico

Para llevar a cabo las pruebas estadísticas *ANOVA*, *Tukey*, *Kruskal-Wallis*, *Dunn*, *U de Mann Whitney* y el cálculo del coeficiente de correlación de *Pearson* se empleó el software *RStudio*, versión 1.1.463, considerando como significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los gráficos de valores individuales, caja y bigote y dispersión con su respectiva regresión lineal fueron generados utilizando el *software* antes mencionado en conjunto con la paquetería *ggplot2*. Las medidas de tendencia central se obtuvieron con el programa *Excel*, versión 16.13.1.

---

<sup>5</sup> ***ACTB (Beta Actina)***: codifica para una proteína que conforma el aparato contráctil celular y para un componente citoesquelético de células no musculares. Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 7 en el brazo p y cuenta con seis exones (National Center for Biotechnology Information, 2019a).

<sup>6</sup> ***GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)***: codifica para un producto proteico que participa en la catálisis de una de las etapas del metabolismo de los carbohidratos (glucólisis). Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 12 en el brazo p y cuenta con diez exones (National Center for Biotechnology Information, 2019b).

## Resultados

Evaluación de la concentración del RNA total obtenido de muestras de tejido *post mortem*

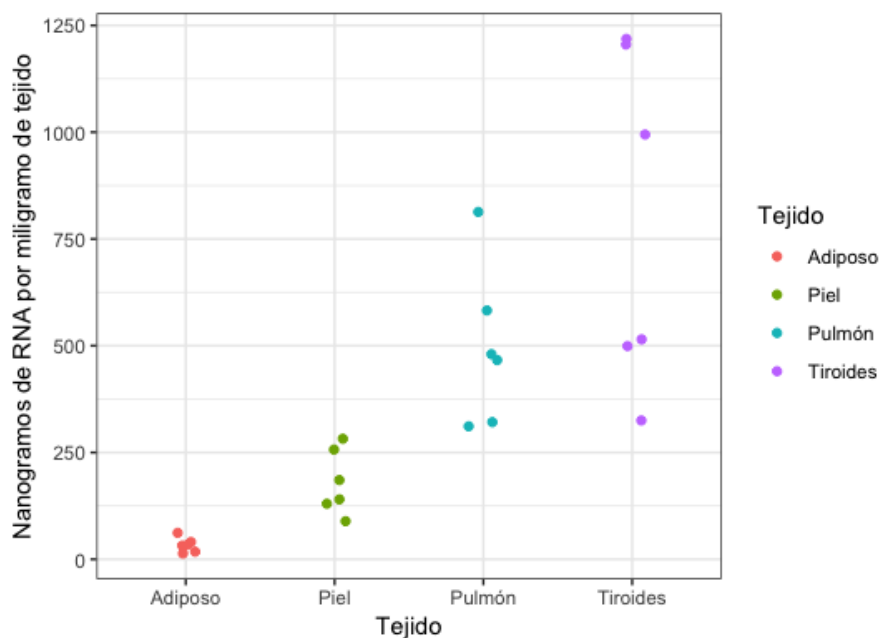
Se logró extraer RNA a partir de las 26 muestras procesadas, obteniendo las siguientes concentraciones y valores de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (*Tabla 5*):

**Tabla 5. Concentraciones y valores de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 del RNA obtenido a partir de las muestras procesadas.** Se incluyen los datos de las 24 muestras de tejido *post mortem*, los de la línea celular y la biopsia tumoral (controles técnicos). En la columna "Muestra" se indica el tejido del que se trata y el número hace referencia al individuo al que pertenece.

Muestra	Concentración de RNA		
	(ng/μL)	A <sub>260/A280</sub>	A <sub>260/A230</sub>
Adiposo 1	59.07	1.67	1.05
Adiposo 2	67.27	1.69	0.79
Adiposo 3	18.20	1.64	0.31
Adiposo 4	117.79	1.73	1.41
Adiposo 5	25.01	1.63	0.24
Adiposo 6	40.85	1.69	0.91
Piel 1	220.76	1.81	1.23
Piel 2	256.28	1.90	1.43
Piel 3	166.74	1.80	0.87
Piel 4	190.05	1.86	1.49
Piel 5	188.06	1.80	1.66
Piel 6	222.86	1.89	0.78
Pulmón 1	840.25	1.85	2.15
Pulmón 2	560.43	1.83	2.24
Pulmón 3	845.39	1.65	0.19
Pulmón 4	1625.99	1.77	0.40
Pulmón 5	629.39	1.63	0.14
Pulmón 6	758.67	1.63	0.17
Tiroides 1	874.25	1.78	1.34
Tiroides 2	926.43	1.83	1.96
Tiroides 3	2219.75	1.83	1.91
Tiroides 4	1729.67	1.81	1.41
Tiroides 5	2415.66	1.88	1.91

Tiroides 6	561.26	1.83	1.92
MDA-MB-468	238.7	1.86	1.18
Tumor	119.0	1.92	1.35

Para evaluar a partir de qué tejido se obtenía una mayor eficiencia en la extracción de RNA se realizó un ajuste, el cual consistió en considerar la concentración de RNA previamente reportada (*Tabla 5*), el volumen total de elución en agua grado biología molecular en  $\mu\text{L}$  (*Inciso 18*, apartado *Extracción del RNA*) y el peso en mg de cada muestra procesada (*Tabla 2*). Con estos datos se calculó la cantidad de RNA total obtenido por mg de tejido, observando que existe una mayor variación en la cantidad de RNA que se obtiene de tiroides, la cual también presenta la mediana más grande con un valor de 1328.05 y el mayor número de ng de RNA obtenidos por mg de tejido (1218.30), le siguen pulmón (mediana = 799.46), piel (mediana = 205.41) y adiposo subcutáneo (mediana = 49.96), que presenta una distribución más homogénea y el valor más bajo (25.01) de ng de RNA obtenidos por mg de tejido (*Figura 7*):



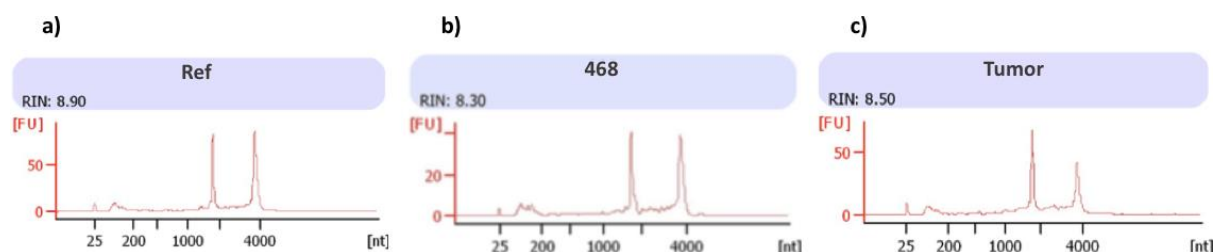
**Figura 7. Distribución de la cantidad de RNA obtenido por tejido.** Gráfica de valores individuales en la que se muestra la distribución de las cantidades de RNA obtenidas en ng/mg de tejido. En color naranja se muestra el comportamiento de los datos obtenidos a partir de tejido adiposo; en verde los de piel; en azul los de pulmón y en lila los obtenidos de tiroides.

Aunado a lo antes descrito, se obtuvo por tipo de tejido el valor de la media de RNA total en ng obtenidos por mg de tejido procesado, el cual fue de 792.87 [ng/mg] para tiroides, 495.73 [ng/mg] para pulmón, 180.75 [ng/mg] para piel y 33.32 [ng/mg] para adiposo subcutáneo. Con base en esto, se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de RNA total extraído por tejido (*Kruskal-Wallis*;  $p = 0.0001613$ ). Esa diferencia se presenta de forma específica entre tejido adiposo subcutáneo y pulmón (*Dunn*;  $p = 0.0033$ ), tejido adiposo y tiroides (*Dunn*;  $p = 0.0001$ ) y tiroides y piel (*Dunn*;  $p = 0.0269$ ). Lo antes descrito refleja que la cantidad de RNA obtenido por mg de tejido es considerablemente menor a partir de adiposo subcutáneo en relación con pulmón y tiroides; y también menor para piel en relación con tiroides.

#### Evaluación de la integridad del RNA total obtenido de muestras de tejido *post mortem*

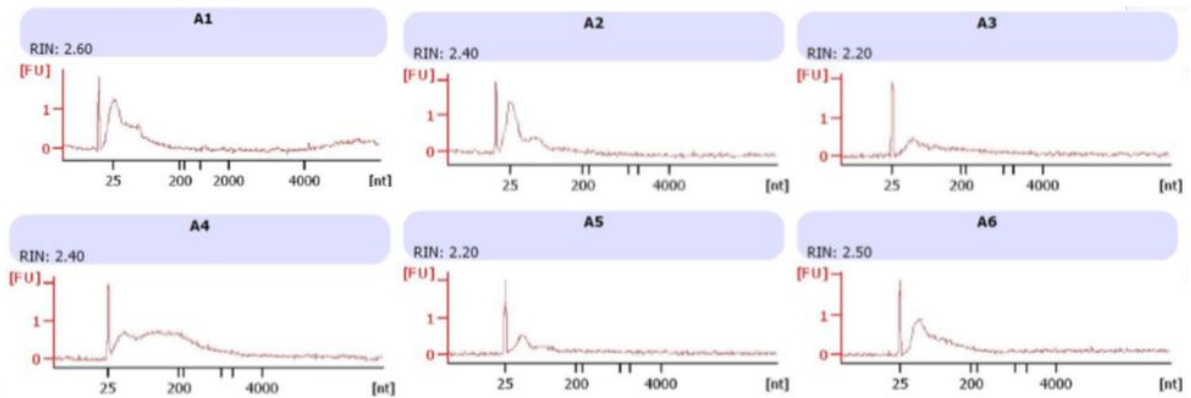
Tras realizar la evaluación de la integridad del RNA total mediante la técnica de electroforesis capilar, se obtuvo como resultado el valor del RIN y el electroferograma de cada muestra analizada (*Figura 8b – 12*).

Los resultados obtenidos de las muestras de RNA de tejido *post mortem* se compararon con los que se obtendrían a partir de una muestra de referencia con un RIN alto (*Figura 8a*, tomada de Guerrero et al., 2016) y con los que se obtuvieron del RNA de las muestras que fungieron como controles técnicos (*Figura 8b y 8c*).

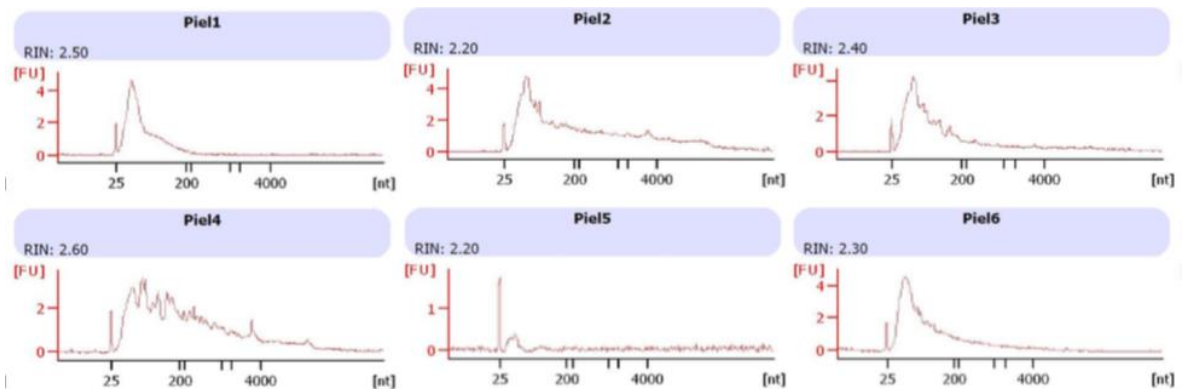


**Figura 8. Electroferogramas de integridad de la muestra de referencia y los controles técnicos.** Se muestra el electroferograma obtenido como resultado de la implementación de la técnica de electroforesis capilar para el análisis de la integridad del RNA total de una muestra de a) Referencia con RNA íntegro identificada como “Ref”; b) La línea celular MDA-MB-468 y; c) La biopsia tumoral de mama. Sólo por practicidad la muestra de la línea celular fue identificada en este caso con la leyenda “468” y la biopsia tumoral con la leyenda “Tumor”. En los tres electroferogramas se muestra el valor del RIN obtenido. El electroferograma de referencia fue tomado y modificado de Guerrero et al. (2016).

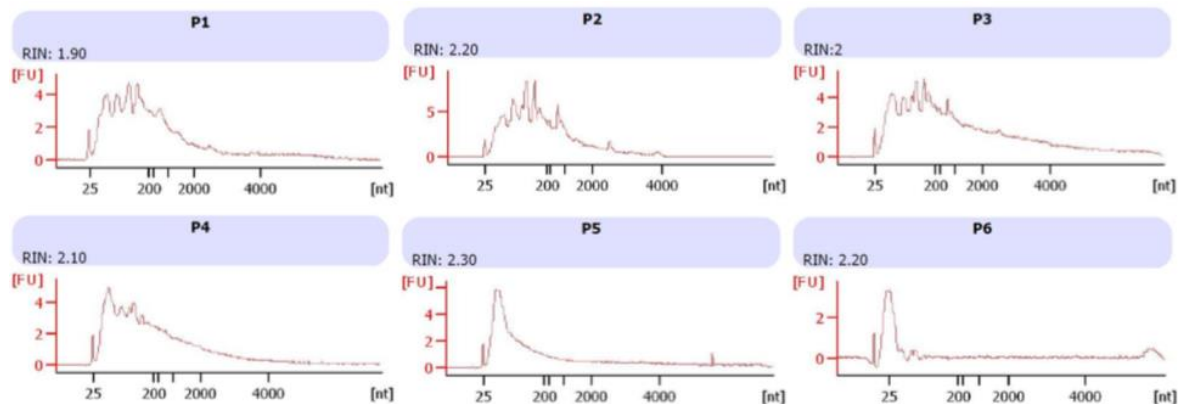




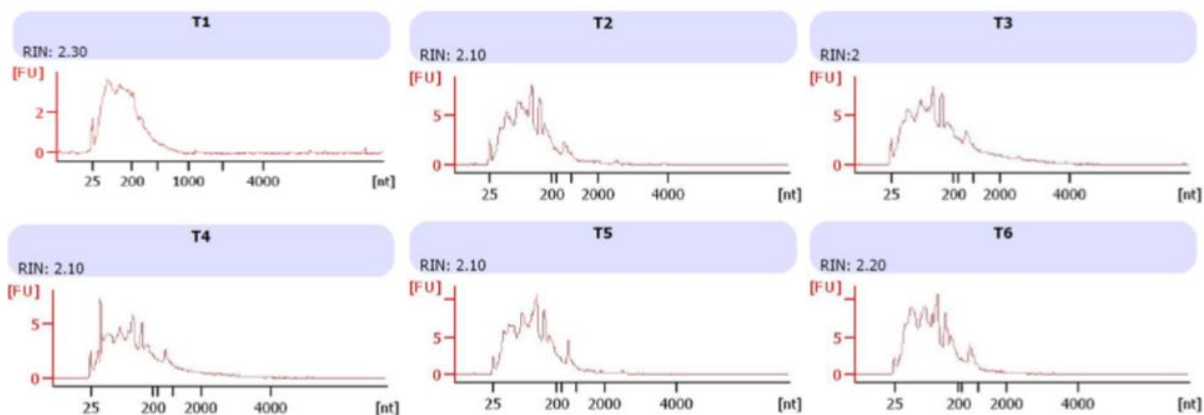
**Figura 9. Electroferogramas de integridad de muestras de tejido adiposo subcutáneo.** Se muestran los electroferogramas obtenidos como resultado de la implementación de la técnica de electroforesis capilar para el análisis de la integridad del RNA total de muestras de tejido adiposo subcutáneo. Por practicidad, las muestras fueron identificadas con una “A” que indicaba que se trataba de adiposo subcutáneo, seguida de un número que mostraba a qué individuo pertenecía. En cada electroferograma se muestra el valor del RIN obtenido.



**Figura 10. Electroferogramas de integridad de muestras de piel.** Se muestran los electroferogramas obtenidos como resultado de la implementación de la técnica de electroforesis capilar para el análisis de la integridad del RNA total de muestras de piel. Las muestras fueron identificadas con la palabra “Piel” seguida de un número que indicaba a qué individuo pertenecía. En cada electroferograma se puede observar el valor del RIN obtenido.

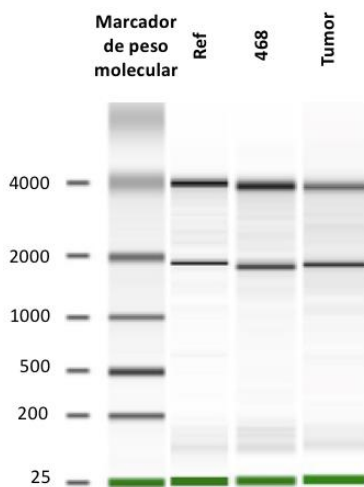


**Figura 11. Electroferogramas de integridad de muestras de pulmón.** Se muestran los electroferogramas obtenidos como resultado de la implementación de la técnica de electroforesis capilar para el análisis del RNA total de muestras de pulmón. Sólo por practicidad, las muestras fueron identificadas con una letra “P” que indicaba que se trataba de pulmón, seguida de un número que mostraba a qué individuo pertenecía. En cada electroferograma se puede observar el valor del RIN obtenido.

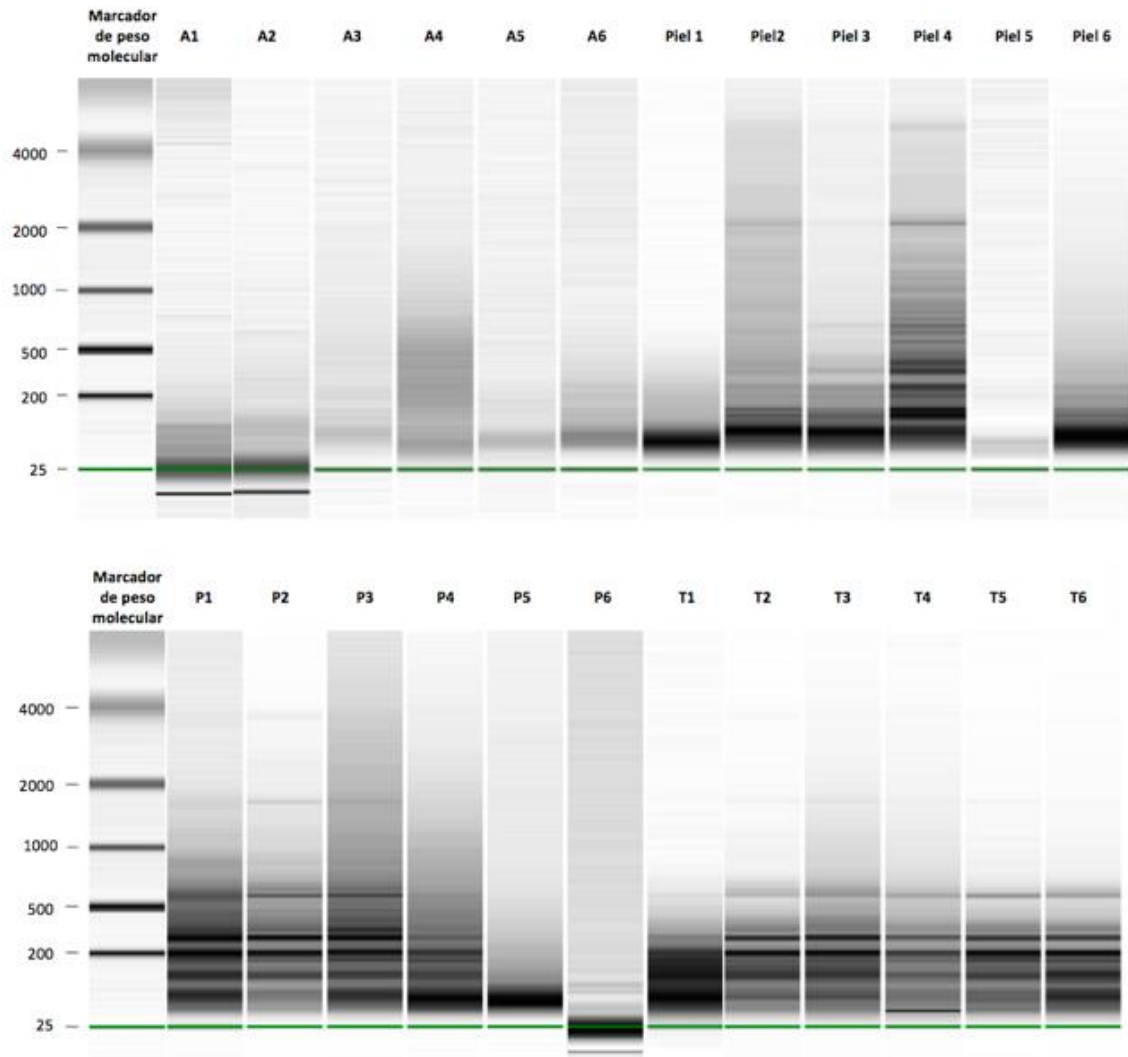


**Figura 12. Electroferogramas de integridad de muestras de tiroides.** Se muestran los electroferogramas obtenidos como resultado de la implementación de la técnica de electroforesis capilar para el análisis del RNA total de muestras de tiroides. Sólo por practicidad, las muestras fueron identificadas con una letra “T” que indicaba que se trataba de tiroides, seguida de un número que mostraba a qué individuo pertenecía. En cada electroferograma se puede observar el valor del RIN obtenido.

De forma adicional a los valores del RIN y los electroferogramas, también se obtuvieron representaciones gráficas de cómo se visualizaría cada muestra si hubiera sido corrida en un gel de agarosa en una electroforesis, con lo que de forma general se observó que el RNA obtenido de los controles técnicos se comportaba de manera muy similar al de la muestra de referencia, ya que las bandas pertenecientes a los RNA ribosomales 18S y 28S eran evidentes y no se presentaba el patrón de barrido característico (*smear*) de muestras de RNA degradado, indicando que se trataba de un RNA íntegro (*Figura 13*).



**Figura 13. Gel de integridad de muestras de referencia.** Representación gráfica de cómo se visualizaría la distribución de los fragmentos de una muestra de RNA íntegro (referencia), de la línea celular MDA-MB-468 y de la biopsia tumoral (ambos controles técnicos) si hubieran sido corridos en un gel de agarosa en una electroforesis. En el primer carril de izquierda a derecha se encuentra el marcador de peso molecular y hacia la derecha la muestra de referencia, seguida de la de la línea celular y finalmente el tumor. Para fines prácticos, las muestras fueron identificadas con la etiqueta “Ref” de Referencia, “468” de MDA-MB-468 y “Tumor” de biopsia tumoral. La imagen de referencia fue tomada y modificada de Guerrero et al. (2016).

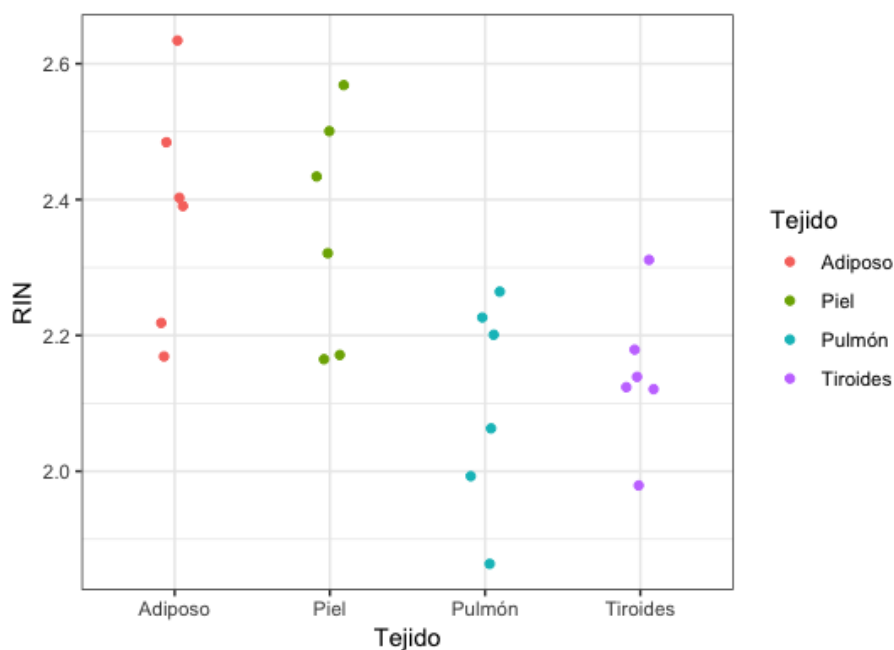


**Figura 14. Gel de integridad de muestras de tejido *post mortem*.** Representación gráfica de cómo se visualizaría la distribución de los fragmentos de RNA de cada muestra de tejido *post mortem* analizada si hubiera sido corrida en un gel de agarosa en una electroforesis. En el primer carril de izquierda a derecha se encuentra el marcador de peso molecular y hacia la derecha las muestras de RNA de interés. Para fines prácticos, las muestras fueron identificadas con la letra “A” de adiposo subcutáneo, “P” de pulmón, “T” de tiroides y la leyenda “Piel” para piel, todas seguidas del número que mostraba a qué individuo pertenecían.

El RNA obtenido de las muestras de tejido *post mortem* se encontraba degradado en todos los casos, pues el bandeo distribuido por todo el carril indicaba la existencia de fragmentos de diversos tamaños, la mayoría con un peso por debajo de las 500 bases según el marcador de peso molecular e incluso muestras como adiposo subcutáneo 1 y 2 y piel 6, presentaban fragmentos con un peso por debajo de las 25 bases. En el caso de todas las muestras de tejido adiposo, piel 5 y pulmón 5, se observó poco bandeo a lo largo del carril probablemente derivado de las bajas concentraciones de RNA obtenidas a partir de éstas. Sólo en el caso de piel 2, 3 y 4; pulmón 1, 2 y 3; y tiroides 2, 3, 4 y 5; se pudieron observar muy tenuemente las

dos bandas de RNA ribosomal 18S y 28S (*Figura 14*), las cuales suelen encontrarse ligeramente por debajo de las bandas cuyo peso, según el marcador de peso molecular, oscila entre los 4000 y 2000 nucleótidos.

Con base en los valores de RIN reportados, se obtuvo que el tejido adiposo subcutáneo es el que presenta la mayor media y mediana con valores de 2.38 y 2.40, respectivamente, seguido de piel (media = 2.37; mediana = 2.35). Tiroides presentó una media de 2.13 de valor de RIN y una mediana de 2.10, mientras que pulmón una media 2.12 y una mediana 2.15. El valor más bajo de RIN fue de 1.90 y se presentó en pulmón y el más alto fue de 2.6 y lo presentaron piel y adiposo subcutáneo (*Figura 15*).



**Figura 15. Distribución de los valores del RIN obtenido por tejido.** Gráfica de valores individuales en la que se muestra la distribución de los valores de RIN obtenido por tejido. En color naranja se muestra el comportamiento de los datos obtenidos a partir de tejido adiposo; en verde los de piel; en azul los obtenidos a partir de pulmón y en lila los obtenidos de tiroides.

Los valores de RIN varían de forma estadísticamente significativa entre tejidos (*ANOVA*;  $p = 0.00458$ ). De forma específica, los valores de RIN de tejido adiposo subcutáneo son diferentes a los de pulmón (*Tukey*;  $p = 0.0226903$ ) y a los de tiroides (*Tukey*;  $p = 0.0348274$ ), por su parte, los valores de RIN de piel y pulmón también difieren entre sí (*Tukey*;  $p = 0.0346174$ ).

## Evaluación de la amplificación del mRNA de muestras de tejido *post mortem*

Teniendo en cuenta los valores de RIN obtenidos y descritos previamente, se procedió a evaluar la factibilidad de obtener productos de amplificación de los genes *ACTB* y *GAPDH* mediante la técnica de RT-qPCR, realizando tres réplicas técnicas para cada muestra y obteniendo con ello los valores de Ct<sup>7</sup> de cada réplica.

Se evaluaron los genes antes mencionados debido a que ambos se expresan de forma constitutiva en cualquier tejido, es decir, son genes *housekeeping*, lo que permitía que independientemente de si se trataba de muestras de tejido adiposo subcutáneo, tiroides, piel o pulmón, era posible evaluar la factibilidad de obtener productos de amplificación de esos genes a partir de cualquiera de ellos.

En el caso de los controles técnicos, la línea celular MD-MB-468 presentó valores de Ct para *ACTB* considerando sus réplicas técnicas de 20.46, 20.65 y 20.86 (media =  $20.66 \pm 0.2$ ), mientras que para *GAPDH* los valores fueron de 22.84, 22.34 y 22.99 (media =  $22.72 \pm 0.34$ ). Por otra parte, para la muestra tumoral los valores de *ACTB* considerando las réplicas técnicas fueron 29.62, 29.13 y 29.28 (media =  $29.34 \pm 0.25$ ) y los de *GAPDH* fueron 30.39, 30.4 y 30.37 (media =  $30.39 \pm 0.016$ ).

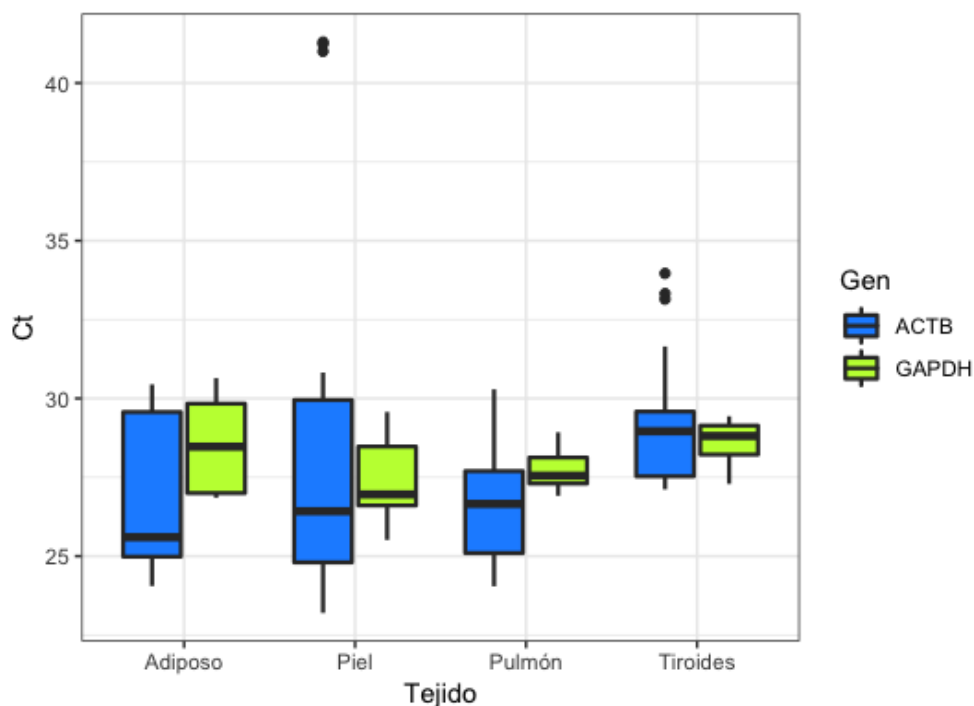
En relación con las muestras de tejido *post mortem*, para el caso de *ACTB*, el tejido que presentó una menor variabilidad en sus valores de Ct fue tiroides, que también presentó la mediana más alta con un valor de 28.96 y tres datos atípicos con valores de 33.15, 33.32 y 33.96, todos de la misma muestra. De acuerdo a qué tan dispersos fueron los datos obtenidos en orden ascendente le siguen pulmón (mediana = 26.65), adiposo subcutáneo (mediana = 25.60) y piel (mediana = 26.42), que es el tejido que presenta una mayor dispersión con tres

---

<sup>7</sup> Ct: se trata de un parámetro importante en la qPCR denominado *threshold cycle* (Ct) que puede ser definido como el ciclo de PCR en el que el nivel de fluorescencia emitida por el agente reportero utilizado en la reacción cruza el umbral que separa a lo que es considerado como ruido y lo que es considerado como amplificación real del amplicón de interés. Este parámetro indica que la amplificación ha comenzado a llevarse a cabo de forma exponencial y su valor es inversamente proporcional a la cantidad de amplicón de interés que hay en la reacción (Livak, 2008).

valores atípicos, que a su vez fueron los más altos (41.00, 41.23 y 41.3) y pertenecían a la misma muestra y el valor más bajo de Ct para este gen, que fue de 23.63 (Figura 16).

En relación con las medias del valor de Ct por tipo de tejido, el valor más bajo lo presentó pulmón con un valor de 26.78 de Ct, seguido de adiposo subcutáneo (media = 26.92), piel (media = 28.81) y finalmente tiroides (media = 29.49), esto último probablemente derivado de los tres datos atípicos que presentó y cuyo valor se mencionó anteriormente. Sin embargo, es importante mencionar que la muestra de tejido adiposo 4 no amplificó en ninguna de sus réplicas técnicas.



**Figura 16. Distribución de los valores del Ct obtenido por tejido y por gen.** Diagrama de caja y bigote en el que se muestra la distribución de los valores de Ct obtenidos por tejido. En azul se muestra el comportamiento de los datos obtenidos para el amplicón de *ACTB* y en verde los obtenidos para *GAPDH*.

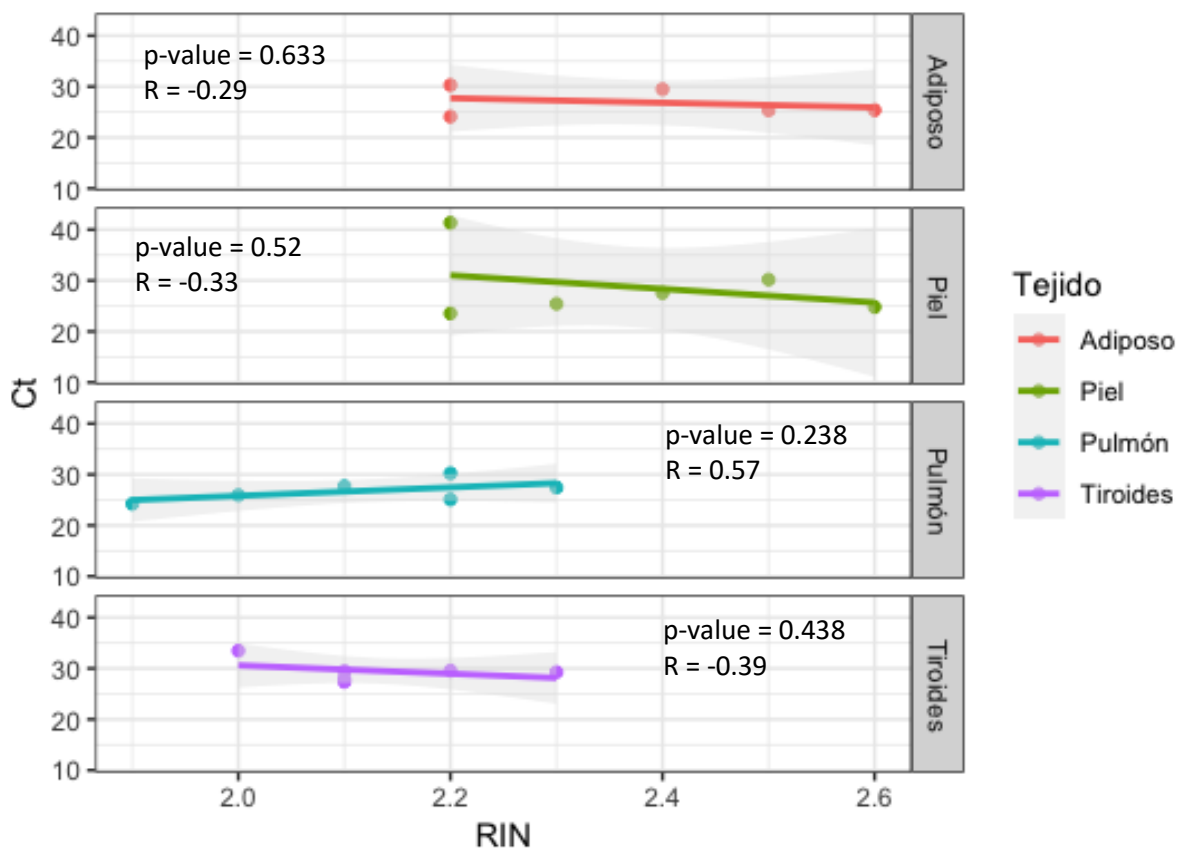
Para el caso de *GAPDH* el tejido con una menor variación en los valores de Ct fue pulmón con una mediana de 27.55, seguido de tiroides (mediana = 28.81), adiposo subcutáneo (mediana = 28.47) y piel (mediana = 26.96) que presentó la mayor variabilidad en los valores de Ct ligeramente por arriba de adiposo subcutáneo. Para este gen no se presentaron datos

atípicos siendo el valor más bajo de Ct de 25.51 reportado para piel y el más alto de 30.64 reportado para adiposo subcutáneo.

En relación con el valor de la media del valor de Ct por tejido, la más baja fue de piel con un valor de 27.30, seguida de pulmón (media = 27.72), adiposo subcutáneo (media = 28.59) y muy ligeramente por arriba de éste, tiroides (media = 28.63).

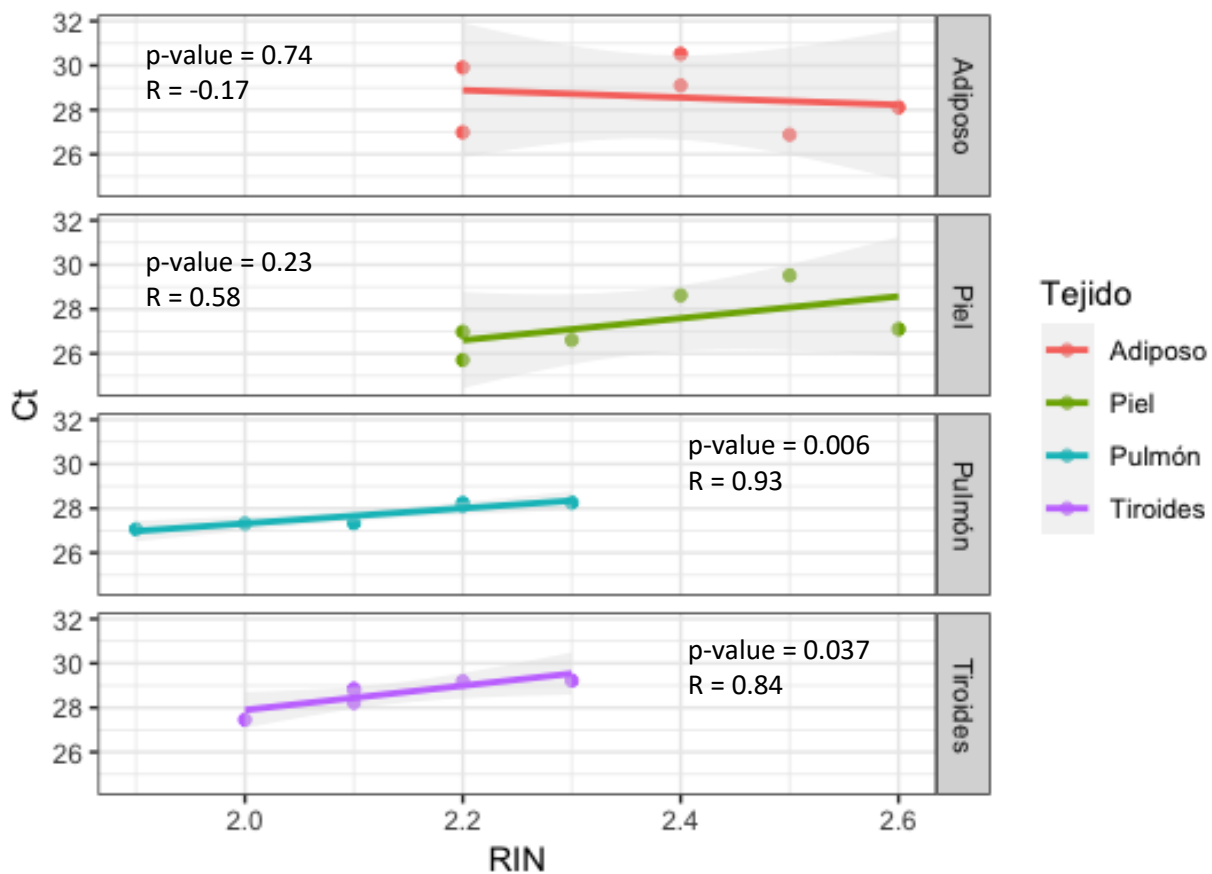
Se observó que para ambos genes existía una diferencia estadísticamente significativa en los valores de Ct obtenidos por tejido (*Kruskal-Wallis*; *ACTB*  $p = 0.04386$  y *GAPDH*  $p = 0.001062$ ). Para el caso de *ACTB* se presentaba solamente entre pulmón y tiroides (*Dunn*;  $p = 0.0379$ ), mientras que para el caso de *GAPDH*, piel presentaba diferencias con tejido adiposo subcutáneo (*Dunn*;  $p = 0.0132$ ) y tiroides (*Dunn*;  $p = 0.0007$ ), así como también existía diferencia entre pulmón y tiroides (*Dunn*;  $p = 0.0413$ ). Aunado a ello, se calculó la media de los valores de Ct de *ACTB* (media = 28.09) y *GAPDH* (media = 28.61) considerando todos los tejidos y se observó que no existe diferencia entre los valores de Ct de ambos genes (*U de Mann Whitney*;  $p = 0.2373$ ).

Por último, se observó que para *ACTB* no existe una correlación estadísticamente significativa entre el nivel de degradación del RNA y el valor del Ct en ningún tejido (*Pearson*;  $-0.39 < r < 0.57$ ;  $p > 0.05$ ) (*Figura 17*), mientras que para *GAPDH* esa correlación se presenta en pulmón (*Pearson*;  $r = 0.93$ ;  $p = 0.006$ ) y tiroides (*Pearson*;  $r = 0.84$ ;  $p = 0.037$ ), lo que indica que sí existe una correlación estadísticamente significativa entre el valor del RIN y el Ct de este gen para esos dos tejidos. En relación con tejido adiposo subcutáneo y piel no se presentó una correlación estadísticamente significativa entre el valor del RIN y el Ct (*Pearson*;  $r$  adiposo =  $-0.17$ ;  $r$  piel =  $0.58$ ;  $p > 0.05$ ) (*Figura 18*).



**Figura 17. Correlación RIN vs Ct por tejido para ACTB.** Diagrama en donde se muestra la correlación que existe por tejido entre el valor del RIN de las muestras analizadas y el valor de Ct de ACTB (media de las réplicas técnicas) de las mismas.





**Figura 18. Correlación RIN vs Ct por tejido para GAPDH.** Diagrama en donde se muestra la correlación que existe por tejido entre el valor del RIN de las muestras analizadas y el valor de Ct de GAPDH (media de las réplicas técnicas) de las mismas.

## Discusión

Determinar el Intervalo *Post Mortem* (IPM) es algo necesario durante la investigación de hechos posiblemente constitutivos de delito que implican la muerte de una o varias personas. Aunque en la actualidad en la Ciencia Forense existen métodos convencionales para estimar el IPM, tales como el médico, el químico y el entomológico; las desventajas y limitaciones que presentan han motivado que otras áreas del conocimiento, como la Genética, la Biología Molecular y la Genómica, a tratar de implementar otros métodos que puedan ser complementarios a los convencionales, con el fin de hacer de la estimación de este parametro algo más objetivo y preciso.

Desde la Genética Forense se ha vislumbrado que el estudio del RNA podría servir para establecer el IPM a través de los cambios en su integridad y más recientemente, en la expresión génica (Sampaio et al, 2013; Ferreira et al, 2018). Sobre esto último, algunos trabajos han sido desarrollados empleando modelos animales y otros, muestras de tejido humano o datos derivados a partir de ellas, tal y como se hizo en el trabajo realizado por Ferreira et al. (2018). Estos investigadores propusieron un modelo para predecir el IPM basado en el análisis de datos de expresión de genes codificantes generados con RNA-seq a partir de muestras de tejido adiposo subcutáneo, piel, tiroides y pulmón. El modelo matemático propuesto por este grupo de investigadores se derivó del análisis de datos de expresión génica provenientes de muestras de tejido humano colectadas bajo condiciones controladas, como parte de la construcción de la bases de datos *GTEX Portal*; y aunque se propone que podría ser una herramienta potencial para la estimación del tiempo de muerte en el campo forense, lo cierto es que no ha sido probado con muestras características de este tipo de investigaciones, provenientes de cadáveres que se encontraron sometidos a condiciones no controladas y/o incluso desconocidas (Ferreira et al, 2018).

Teniendo en cuenta que el análisis del RNA mediante técnicas de secuenciación masiva implica llevar un flujo de trabajo que contempla la extracción, la evaluación de la concentración e integridad del RNA total, seguidas de la depleción del rRNA, la preparación de la biblioteca genómica, la secuenciación y finalmente el análisis bioinformático, en este trabajo se ha evaluado la cantidad y el valor de integridad del RNA que se obtiene a partir de muestras de tejido adiposo, piel, pulmón y tiroides, provenientes de cadáveres a los que se les practicó la necropsia en el Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO) de la Ciudad de

México, lo que permitió determinar la factibilidad de utilizar el RNA obtenido de estas muestras como material para establecer el IPM a través del uso de herramientas de análisis molecular para la expresión génica. Se eligió trabajar con estos tejidos debido a que son los que el modelo de Ferreira et al. (2018) requiere para ser implementado.

Tras realizar la extracción del RNA total se observó que la cantidad de esta molécula obtenida por mg de tejido es variable y depende del tipo de tejido en cuestión; sin embargo, es de adiposo subcutáneo y piel a partir de los cuales se obtiene considerablemente menor cantidad de RNA en comparación con lo que se obtiene de tiroides y pulmón, lo cual indica que al momento de llevar a cabo la colección de muestras sería recomendable coleccionar mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo y piel en relación con los otros dos tejidos, con el fin de asegurar en la medida de lo posible la extracción de cantidades de RNA adecuadas que permitan realizar los pasos posteriores en el procesamiento de las muestras, entre los que se encuentran la medición de la concentración, el análisis de la integridad del RNA total y los pasos específicos que se requiera llevar a cabo según la técnica de análisis de la expresión génica requerida.

Como parte de este trabajo, el protocolo para realizar la RT requería partir de 100 ng de RNA por muestra; sin embargo, para técnicas como la secuenciación masiva, en la actualidad se han desarrollado nuevos protocolos para la preparación de las bibliotecas genómicas altamente sensibles, lo cual hace posible trabajar con cantidades mínimas de RNA total de tan sólo 10 ng en el caso de muestras con valores altos de integridad o 20 ng en el caso de muestras altamente degradadas (Schuierer et al., 2017). Por otra parte, en relación con el análisis de la expresión génica mediante microarreglos,<sup>8</sup> hoy en día existen protocolos de trabajo que requieren de cantidades mínimas de inicio de 20 ng de RNA total altamente degradado, en el peor de los casos (Affymetrix Technologies, 2013). Lo anterior implica que en términos de cantidad de RNA, sería factible analizar con RT-qPCR, secuenciación y/o microarreglos cualquiera de las muestras de tejido *post mortem* procesadas en este estudio, dado que todas se presentaron por encima de la cantidad mínima requerida para realizar

---

<sup>8</sup> **Microarreglos de expresión:** soportes de nylon, nitrocelulosa, vidrio, silicio u otros materiales sintéticos que cuentan con oligonucleótidos adheridos contra los cuales hibridan segmentos de cDNA marcados fluorescentemente obtenidos de las muestras de interés, permitiendo determinar la expresión de una serie de genes simultáneamente. Los patrones de hibridación se convierten directamente en información sobre los genes expresados en la muestra (Kahl, 2015).

ensayos de expresión génica con estas técnicas. No obstante, es necesario nunca perder de vista que se necesita contar con una cantidad de RNA que permita llevar a cabo, además de la implementación de secuenciación, el análisis con microarreglos o de la RT-qPCR, el resto de los pasos que forman parte del flujo de trabajo con esta molécula, como son la cuantificación y el análisis de la integridad de las muestras.

Aunado a esto, contar con material extra con el cual trabajar siempre es mejor que contar con escasas cantidades de muestra, que pongan en riesgo la determinación de ciertos parámetros durante una investigación forense, tal como lo es el IPM. Aunque se sabe que, en una investigación de este tipo a veces resulta complicado que el personal tenga acceso a grandes cantidades de material biológico, la realidad es que al momento de llevar a cabo la necropsia, el médico forense podría ayudar a coleccionar lo necesario (tal y como ocurrió para este estudio), lo que a su vez evidencia la importancia de mantener una buena comunicación con el personal de otras áreas del conocimiento que se encuentre involucrado en la investigación.

Por otra parte, en relación con los valores de integridad del RNA (RIN), se observó que estos difieren de forma estadísticamente significativa entre tejidos a pesar de haber sido colectados a partir del mismo individuo, lo que sugiere que la degradación del RNA ocurre de forma tejido específica, tal y como lo han reportado Sampaio et al. (2013) y van den Berge et al. (2016). Adicionalmente, este último grupo de investigadores también reportó que pulmón pero sobre todo piel, son los tejidos a partir de los cuales se dificulta más obtener perfiles de mRNA de muestras de restos humanos exhumados durante IPM tardíos, en comparación con otros como cerebro, corazón, riñón, músculo esquelético o hígado, lo cual podría ser producto de la rápida degradación del RNA que se da desde IPM tempranos, tal y como se observó en la presente investigación, en donde aunque pulmón fue el tejido que presentó los valores más bajos de RIN, es evidente que también para piel la degradación del RNA se da de forma rápida, dado que este tejido normalmente se mantiene en contacto directo con las diversas superficies del medio exterior a las cuales el cadáver se encuentra expuesto, favoreciendo su exposición a enzimas degradadoras del RNA (RNAsas) provenientes de microorganismos; probablemente en algún punto del IPM la tasa de degradación entre estos dos tejidos se invierta, derivando en que para IPM tardíos resulte aún más complejo obtener perfiles de RNA a partir de piel que de pulmón.

El tema de la integridad del RNA juega un papel muy importante a la hora de realizar análisis globales de expresión génica con tecnologías de secuenciación masiva, pues aunque no existe una regla absoluta, en diversos protocolos de trabajo con muestras de tejido fresco se considera que muestras con un RIN de 7 a 10 usualmente satisfacen los requisitos para llevar a cabo análisis de transcriptoma completo o secuenciación de mRNA, mientras que un RIN menor de 7 pero mayor a 5 representa que la muestra se encuentra parcialmente degradada, y aunque, todavía en ese punto es posible realizar análisis de transcriptoma, la secuenciación de mRNA podría empezar a verse afectada por la pérdida de las colas de poli-A en el extremo 3'. Por otra parte, con un RIN de 5 o menor se considera que sólo es posible llevar a cabo la secuenciación de transcriptomas completos (Exiqon Services, 2014). No obstante, tal y como mencionaron (Gallego Romero, Pai, Tung, & Gilad, 2014), a pesar de las recomendaciones establecidas en los protocolos, lo cierto es que no existe un consenso sobre el valor de la integridad con el cual una muestra deje de ser considerada como útil (Gallego et al., 2014), por lo que finalmente el investigador es quien establece los valores de corte para definir cuándo una muestra es de “alta calidad” o cuándo es de “baja calidad”, y con base en ello determina si procede o no a secuenciarla. Por ejemplo, en el caso del *GTE<sub>x</sub> Portal*, las muestras que se consideran óptimas para su inclusión en esta base de datos cuando presentan un valor mínimo de RIN de 5.7 (Carithers, 2015).

Como parte de este trabajo se obtuvieron valores de RIN de las muestras de tejido *post mortem* que oscilaban entre 1.9 y 2.6, lo que de acuerdo a algunos protocolos convencionales para la preparación de bibliotecas genómicas sólo sirve para secuenciar transcriptomas completos debido a la pérdida de las colas de poli-A, siendo necesario modificar para ello el tiempo de fragmentación del RNA durante la preparación de la biblioteca genómica según el valor de integridad de la muestra, ya sea disminuyéndolo o incluso eliminándolo por completo con el fin de evitar su sobre fragmentación (illumina, 2016b). En este caso, la muestra de RNA de la línea celular MDA-MB-468 y de la biopsia tumoral fungieron únicamente como controles de calidad con los cuales se comprobó que los valores bajos de RIN obtenidos de las muestras de tejido *post mortem* no se debían a un mal procesamiento de las mismas por parte de los recursos humanos, sino a características propias de las muestras, pues mientras la línea celular y la biopsia tumoral habían sido tratadas bajo condiciones muy

cuidadas de laboratorio, las muestras de tejido *post mortem* pertenecían a un entorno forense con condiciones no controladas, lo que derivaría en la degradación de su RNA.

El primer indicio que se tuvo sobre el tamaño de los fragmentos de RNA de las muestras analizadas fue a través de las imágenes obtenidas mediante el análisis de la integridad que sugerían que para la mayoría de las muestras de tejido *post mortem* los fragmentos de RNA se encontraban con un peso por debajo de los 500 nucleótidos (*Figura 14*); lo que ponía en duda si a partir de ellas se podría amplificar regiones génicas codificantes, siendo esta la razón por la que se realizaron ensayos de RT-qPCR.

Con base en lo antes mencionado, los valores de Ct de *ACTB* y *GAPDH* obtenidos de los controles técnicos y los obtenidos de las muestras de tejido *post mortem* no se compararon entre sí para saber si existía una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, debido a que autores como Kozera y Rapacz (2013), han reportado que no es conveniente comparar los resultados obtenidos de ensayos de análisis de expresión génica de muestras con valores de RIN muy diferentes, debido al sesgo que los distintos niveles de degradación del RNA en las muestras podría generar. Sin embargo, se observó que los valores de Ct de las muestras de tejido *post mortem* son variables y se alejan más de la desviación estándar estimada para la línea celular y la biopsia tumoral que contaban con RNA íntegro. Por otra parte, cuando se realizó esta comparación por tejido entre las muestras de interés forense se observó una variabilidad del Ct estadísticamente significativa para *ACTB* entre pulmón y tiroides, y para *GAPDH* entre piel en relación con tejido adiposo subcutáneo y tiroides; y también entre pulmón con esta última, por lo que inicialmente se pensó que la variabilidad del valor Ct existente tanto inter, como intra tejidos (considerando los seis datos atípicos registrados para *ACTB*), podría ser producto del alto nivel de degradación del RNA; no obstante, se observó que al menos estadísticamente no existe una correlación significativa entre el valor del RIN y los valores de Ct para casi ningún tejido, excepto para pulmón y tiroides que sí presentaron una correlación estadísticamente significativa cuando se evalúa *GAPDH*, lo que sugiere que el nivel de integridad del RNA no siempre afecta los valores de Ct de los genes evaluados porque la degradación además de darse de forma tejido específica, también podría ocurrir de forma transcrito específica, según la capacidad de los transcritos para formar estructuras secundarias y/o terciarias, de acuerdo a lo mencionado por Fordyce et al. (2013).

En relación con los valores de Ct que no se ven influenciados directamente por el nivel de integridad del RNA, es posible que la variación existente pueda ser generada por el efecto de otras variables como el IPM, la causa de muerte, el sexo, la edad e incluso el índice de masa corporal, tal y como describieron Koppelkamm et al. (2010), cuando trabajaron con muestras de músculo esquelético, tejido cardíaco y cerebro de cadáveres humanos a los que se les practicó la necropsia, evaluando el efecto de estas variables en la expresión de un panel de genes. Sería interesante realizar un estudio en el que se amplie el número de muestras por tejido y se investigue el efecto de esas variables en la cantidad, integridad y capacidad de amplificación del RNA obtenido a partir del tipo de tejidos procesados como parte de esta investigación (Koppelkamm et al., 2010).

A pesar de la variabilidad en los valores de Ct obtenidos de forma intra e inter tejidos, en el presente estudio se demostró que es factible generar productos de amplificación de regiones codificantes con un tamaño mínimo de entre 157<sup>9</sup> a 171<sup>10</sup> bases a partir de muestras de tejido adiposo subcutáneo, piel, pulmón e incluso tiroides (que presentó la media más alta del valor de Ct para ambos genes).

Además de la RT-qPCR como herramienta de análisis molecular, cuando se requiere llevar a cabo análisis de expresión génica pero a nivel global con secuenciación masiva de muestras con valores bajos de RIN, una alternativa que existe como parte del trabajo experimental consiste en el empleo de protocolos para la preparación de bibliotecas genómicas especializados en el tratamiento de muestras de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE, del inglés *Formalin-fixed paraffin-embedded*). Estas muestras suelen ser difíciles de procesar en distintos ensayos moleculares debido a la alta fragmentación del RNA derivada del proceso de fijación al cual son sometidas como parte de su preservación. Estos protocolos contemplan el enriquecimiento del mRNA obtenido de este tipo de muestras a través de la captura de regiones exónicas ya conocidas mediante sondas biotiniladas complementarias a ellas, a su vez las sondas se unen a estreptavidina, lo cual permite recuperar el conjugado con ayuda de fuerzas magnéticas. A diferencia de los protocolos para FFPE, los protocolos para la preparación de bibliotecas genómicas convencionales a partir de muestras con altos valores de integridad del RNA, se centran en

---

<sup>9</sup> Longitud del amplicón generado para *GAPDH*.

<sup>10</sup> Longitud del amplicón generado para *ACTB*.

capturar las colas de poli-A características de los mRNA, lo que permite capturar a estas moléculas y posteriormente enriquecerlas de forma selectiva, siendo esta la razón por la cual puede no ser siempre funcional emplear estos protocolos en muestras con valores bajos de RIN, debido a que en el mRNA degradado lo primero que se pierde es el extremo 3', complicando con ello su captura y por ende, imposibilitando la amplificación de los mRNA (illumina, 2011, 2016a). La implementación de los protocolos para el tratamiento de FFPEs se ha desarrollado con el fin de obtener resultados confiables a partir del análisis de este tipo de muestras en las que la integridad del RNA se encuentra comprometida, siendo esta la razón por la cual podrían ser implementados para el procesamiento de muestras de interés forense.

Como un ejemplo de la aplicación de este tipo de protocolos, se tiene el trabajo realizado por Eikrem et al. (2016), en donde se evaluó el impacto de la condición de almacenaje en los perfiles de expresión generados a partir de la secuenciación del RNA de tejido sano y tumoral que fueron conservados en parafina y en *RNAlater*,<sup>11</sup> así como el perfil de expresión diferencial entre tumor y tejido sano almacenados bajo las dos condiciones antes mencionadas. Como parte de la metodología, se evaluó el RIN de las muestras y se observó que la media fue de 5.7, con valores de entre 5.1 – 6.3 para las muestras en *RNAlater* y 2.5, con valores de entre 2.3 – 2.7 para las muestras FFPE. Posteriormente, se generaron bibliotecas genómicas de RNA implementando un protocolo de illumina especializado en el trabajo con muestras FFPE y se secuenciaron las muestras. Lo anterior permitió observar que existe una alta correlación entre los niveles de expresión de genes codificantes en muestras almacenadas bajo condiciones diferentes ( $R^2 = 0.97$ ) y los perfiles de expresión diferencial entre tejido normal y tumoral de muestras FFPE y muestras en *RNAlater* ( $R^2 = 0.97$ ).

Por otra parte, además de la secuenciación masiva, se ha observado que el RNA degradado también puede ser analizado mediante el empleo de microarreglos de expresión para tejidos embebidos en parafina. Un trabajo que respalda lo antes descrito es el realizado por personal del Laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en el cual se evaluó la correlación que existe entre los perfiles de expresión génica obtenidos a partir de muestras con valores bajos de RIN por su tratamiento con

---

<sup>11</sup> **RNAlater**: reactivo que detiene los cambios en la integridad y expresión génica, ayuda a estabilizar el RNA.



parafina, con una media de 2.2 y valores de entre 2.1 - 2.4, y los perfiles de expresión obtenidos a partir de muestras de tejido fresco. Las muestras embebidas en parafina y las de tejido fresco fueron analizadas con microarreglos específicos para cada tipo de muestras. En este caso, el material biológico de estudio se trataba de tumores pareados de mama: un fragmento embebido en parafina y el otro fresco congelado. Como resultado se obtuvo que existe una alta correlación ( $R^2 > 0.8$ ) en los niveles de expresión de los genes evaluados en muestras FFPE con valores bajos de RIN con respecto a los de muestras de tejido fresco congelado.

Así como en el caso de la secuenciación, cuando se realiza el análisis de RNA degradado proveniente de FFPE con microarreglos específicos para ello, resulta necesario modificar el tratamiento que se le da a las muestras. En este caso, mientras los protocolos para el trabajo con RNA íntegro realizan el paso de RNA a cDNA utilizando *primers* específicos que hibridan con la cola de poli-A, para el caso de las FFPEs este paso utiliza oligonucleótidos capaces de hibridar con cualquier región de mRNA (*random primers*), dada la degradación de la secuencia de poli-A en el extremo 3' que imposibilita la captura de las moléculas de mRNA a través de esa secuencia (Affymetrix, 2013; Fisher, 2018). Con microarreglos el uso de *random primers* permite rescatar y enriquecer las regiones codificantes para llevar a cabo el análisis de expresión de las muestras de RNA degradadas.

Estas investigaciones señalan que la aplicación de protocolos especializados en el trabajo con muestras FFPE puede ser una buena alternativa cuando se quiere trabajar con muestras de interés forense, que al igual que las primeras, también suelen presentar bajos valores de RIN, tal y como se observó durante la realización del presente trabajo.

En el campo forense resulta de gran relevancia evaluar cuáles de todos los hallazgos obtenidos en laboratorio trabajando bajo condiciones controladas, son realmente aplicables en la investigación de un hecho probablemente constitutivo de delito en el cual los investigadores no pueden controlar ninguna variable y terminan limitándose a realizar determinaciones con los indicios que deriven del mismo. Aunque el trabajo de Ferreira et al. (2018) es relevante, porque antes de este no existía ningún modelo de predicción del IPM para individuos humanos, todavía es necesario evaluar si es factible aplicarlo en

investigaciones forenses reales que ocurren bajo condiciones no controladas. Aunque en el presente trabajo se observó que el procesamiento de muestras de interés forense en ocasiones puede llegar a parecer poco favorable para la aplicación de técnicas de secuenciación masiva del RNA y por ende, la aplicación del modelo de predicción del IPM desarrollado por esos autores, la existencia e implementación de protocolos de trabajo especializado para muestras FFPE, parecen ser una buena alternativa a la cual recurrir cuando quieran llevarse a cabo ensayos moleculares de análisis de expresión génica no sólo con RT-qPCR, sino también globales con secuenciación masiva y/o microarreglos con material forense altamente degradado.

## Perspectivas

En estudios futuros se espera:

- Realizar un estudio en donde se amplíe el número de muestras y se evalúe cómo afectan variables como el IPM, causa de muerte, sexo, edad e índice de masa corporal en la amplificación del RNA de muestras de tejido adiposo subcutáneo, tiroides, piel y pulmón de interés forense.
- Aplicar con muestras forenses el modelo de predicción del IPM propuesto por Ferreira et al. (2018), enfocándose en describir la factibilidad de llevar a cabo el análisis bioinformático de los datos de expresión obtenidos a partir de las muestras de tejido *post mortem* requeridas.

## Conclusión

Con base en los resultados, se puede concluir que las muestras de RNA obtenidas de tejidos colectados en investigaciones forenses reales presentan cantidades variables de RNA dependiendo del tejido en cuestión y que, en casi todos los casos, el RNA presentará grados considerables de degradación. Sin embargo, se demostró que a pesar de lo antes descrito, el RNA obtenido de este tipo de muestras es susceptible de ser amplificado mediante RT-qPCR, lo que sugiere que su análisis posterior con metodologías de análisis genómico global podría ser factible utilizando protocolos específicos para el trabajo con RNA degradado, tales como, los que actualmente se utilizan en el ámbito de la investigación en cáncer, mediante los cuales es factible obtener perfiles de expresión génica con RNA obtenido a partir de bloques de tejido incluido en parafina, en donde los niveles de degradación del RNA son similares a los detectados en muestras forenses. De esta forma, se generan nuevas perspectivas que contemplan el uso de metodologías de análisis del transcriptoma como una opción viable para calcular el Intervalo *Post Mortem* con muestras obtenidas en un entorno forense real.

## Referencias bibliográficas

- Affymetrix. (2013). SensationPlus™ FFPE Amplification and 3' IVT Labeling Kit User Guide. In.
- Alshehhi, S., & Hadrill, P. R. (2019). Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. *Forensic Sci Int*, 298, 58-63. doi:10.1016/j.forsciint.2019.02.046
- Baniak N, C.-B. G., Mulla A, Kalra J. (2014). Vitreous Humor: A Short Review on Post-mortem Applications., 4(199), 1-7. doi:10.4172/2161-0681.1000199
- Bauer, M. (2007). RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*, 1(1), 69-74. doi:10.1016/j.fsigen.2006.11.002
- Bauer, M., Gramlich, I., Polzin, S., & Patzelt, D. (2003). Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Legal Medicine*, 5(4), 220–227. doi:10.1016/j.legalmed.2003.08.001
- Brandi C. McCleskey, D. W. D., Gregory G. Davis. (2016). Review of Postmortem Interval Estimation Using Vitreous Humor: Past, Present, and Future. 6(1), 12-18. doi:<https://doi.org/10.23907/2016.002>
- Budowle, B., Schmedes, S. E., & Wendt, F. R. (2017). Increasing the reach of forensic genetics with massively parallel sequencing. *Forensic Sci Med Pathol*, 13(3), 342-349. doi:10.1007/s12024-017-9882-5
- Calabuig, G. (2004). *Medicina Legal y Toxicología* (E. Villanueva Ed. 6a ed.): Elsevier Masson.
- Carithers, L. J., Ardlie, K., Barcus, M., Branton, P. A., Britton, A., Buia, S. A., . . . Consortium, G. (2015). A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank*, 13(5), 311-319. doi:10.1089/bio.2015.0032
- Carithers, L. J., & Moore, H. M. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. *Biopreserv Biobank*, 13(5), 307-308. doi:10.1089/bio.2015.29031.hmm
- Consortium, G. (2017). Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature*, 550(7689), 204-213. doi:10.1038/nature24277
- Crick, F. (1958). Ideas on Protein Synthesis.
- Estimation of the Time Since Death*. (2016). (B. Madea Ed. 3rd ed.).

- Ferreira, P. G., Muñoz-Aguirre, M., Reverter, F., Sá Godinho, C. P., Sousa, A., Amadoz, A., . . . Guigó, R. (2018). The effects of death and post-mortem cold ischemia on human tissue transcriptomes. *Nat Commun*, 9(1), 490. doi:10.1038/s41467-017-02772-x
- Fisher, T. (2018). GeneChip™ High Throughput WT PLUS Kit Assay Automated Workflow for GeneChip™ Whole Transcript (WT) Expression Arrays on the Beckman Biomek FX P User Guide. In.
- Fordyce, S. L., Kampmann, M. L., van Doorn, N. L., & Gilbert, M. T. (2013). Long-term RNA persistence in postmortem contexts. *Investig Genet*, 4(1), 7. doi:10.1186/2041-2223-4-7
- Forensic Science International. (2017). Forensic Science International: Genetics. (s/d):Elsevier. Retrieved from <https://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international-genetics/>
- Gallego Romero, I., Pai, A. A., Tung, J., & Gilad, Y. (2014). RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol*, 12, 42. doi:10.1186/1741-7007-12-42
- illumina. Evaluating RNA Quality from FFPE Samples Guidelines for obtaining high-quality RNA sequencing results from degraded RNA with Illumina RNA enrichment assays. In.
- illumina. (2011). TruSeq™ RNA and DNA Library Preparation Kits v2 Master-mixed reagents, optimized adapter design, and a flexible workflow provide a simple, cost-effective method for preparing RNA and DNA samples for scalable next-generation sequencing. In.
- illumina. (2016a). Evaluating RNA Quality from FFPE Samples Guidelines for obtaining high-quality RNA sequencing results from degraded RNA with Illumina RNA enrichment assays. In.
- illumina. (2016b). Guía de preparación de muestras de ARN total monocatenario TruSeq. In. Institute, N. C. (s.f.). *GTEx Tissue Processing Procedure*.
- Jashnani, K. D., Kale, S. A., & Rupani, A. B. (2010). Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci*, 55(6), 1523-1527. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01501.x

- Kahl, G. (2015). *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics*. (5th ed.): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Keith. (2010). *Principles Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (K. Wilson & J. Walker Eds. 7th ed.): Cambridge University Press.
- Kozera, B. ł. o., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. In (pp. 391 - 406): Journal of Applied Genetics.
- Lamont, A. E. D. I. L. (2014). Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 6, 8-26. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/00450618.2013.784356>
- Li W, C. Y., Cheng Z, Ling J, Han L, Li X, et al . (2018). Vitreous humor: A review of biochemical constituents in postmortem interval estimation. . *J Forensic Sci Med*, 4, 85-90. doi:10.4103/jfsm.jfsm\_13\_18
- Livak, T. D. S. K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *NATURE PROTOCOLS*, 3(6), 1101 - 1107. doi:doi:10.1038/nprot.2008.73
- Maile, A. E., Inoue, C. G., Barksdale, L. E., & Carter, D. O. (2017). Toward a universal equation to estimate postmortem interval. *Forensic Sci Int*, 272, 150-153. doi:10.1016/j.forsciint.2017.01.013
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2016). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. 1 - 8.
- National Center for Biotechnology Information. (2019a). ACTB actin beta [ Homo Sapiens (human) ]. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/60>
- National Center for Biotechnology Information. (2019b). GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ Homo sapiens (human) ]. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597>
- Portal, G. Tissue Sample Sites. (2019). Retrieved from <https://gtexportal.org/home/anatomogramPage>
- Rivers, D., & Dahlem, G. (2014). *The Science of Forensic Entomology*: WILEY Blackwell.
- Sampaio-Silva, F., Magalhães, T., Carvalho, F., Dinis-Oliveira, R. J., & Silvestre, R. (2013). Correction: Profiling of RNA Degradation for Estimation of. *PLoS One*, 8(6). doi:10.1371/annotation/cb8b37ac-cbe2-45e3-b9fe-d62e7ced4b25

- Schuijjer, S., Carbone, W., Knehr, J., Petitjean, V., Fernandez, A., Sultan, M., & Roma, G. (2017). A comprehensive assessment of RNA-seq protocols for degraded and low-quantity samples. *BMC Genomics*, *18*(1), 442. doi:10.1186/s12864-017-3827-y
- Tag-based Next Generation Sequencing*. (2012). (M. Harsbers & G. Kahl Eds.): WILEY-BLACKWELL.
- Teo Chee Hau, N. H. H., Hing Hiang Lian & Sri Pawita Albakri Amir Hamzah. (2014). Decomposition Process and Post Mortem Changes: Review. *43*(12), 1873–1882.
- van den Berge, M., Wiskerke, D., Gerretsen, R. R., Tabak, J., & Sijen, T. (2016). DNA and RNA profiling of excavated human remains with varying postmortem intervals. *Int J Legal Med*, *130*(6), 1471-1480. doi:10.1007/s00414-016-1438-9
- Vargas, E. (2014). *Medicina Legal* (5a ed.): Editorial Trillas
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, *10*(1), 57-63. doi:10.1038/nrg2484
- Yang, Y., Xie, B., & Yan, J. (2014). Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, *12*(5), 190-197. doi:10.1016/j.gpb.2014.09.001



## Fuentes de ilustración científica

BioRender. (2019). Consultado en:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwifh4WTrYrhAhVDF6wKHRXzBf4QFjAAegQIBBAC&url=https%3A%2F%2Fbiorender.com%2F&usg=AOvVaw04UoZn1HdoBloIIN9TY8os>

Fecha de consulta: 13/03/2019.

Smart SERVIER MEDICAL ART.(s.f.). Consultado en:

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiNrrjRrYrhAhUGKawKHTu5AQkQFjAAegQIBBAC&url=https%3A%2F%2Fsmart.servier.com%2F&usg=AOvVaw35bYQdgvEn9I90CN6xoe\\_Z](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiNrrjRrYrhAhUGKawKHTu5AQkQFjAAegQIBBAC&url=https%3A%2F%2Fsmart.servier.com%2F&usg=AOvVaw35bYQdgvEn9I90CN6xoe_Z)

Fecha de consulta: 13/03/2019.