



SABER, arte y técnica

Minerva. Saber, Arte y Técnica
AÑO IV / VOL. 1 JUNIO DE 2020
ISSN en línea 2545-6245
ISSN impreso 2591-3840

Innovación en técnicas moleculares PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA de *Cannabis sativa* con fines forenses y de inteligencia*

David Gangitano
DG Forensics. Forensic consulting services. Maastricht, Países Bajos
Dr.G@dgforensics.com

Michele Di Nunzio
Universitat de Barcelona, España
michele.dinunzio@ub.edu

Carme Barrot-Feixat
Universitat de Barcelona, España
cbarrotfeixat@ub.edu

RECIBIDO: 22 de marzo de 2020
ACEPTADO: 20 de mayo de 2020

Resumen

Este artículo describe el desarrollo de un método para la identificación genética de *Cannabis sativa* y la asociación de diferentes casos con fines forenses y de inteligencia. Primero, se evaluó un múltiplex STR de 15 loci. Los resultados indicaron que este sistema STR no era adecuado para la identificación forense. Por lo tanto, se desarrolló y optimizó un novedoso multiplex STR de 13 loci para la identificación de *C. sativa*. Se creó una base de datos poblacional de STRs de referencia de cannabis con parámetros de interés forense. Y, por último, se diseñó un panel compatible con MPS de 12 loci STR específicos de cannabis por secuencia. El software STRait Razor v3 se utilizó para analizar y extraer datos de secuencias de STRs. El estudio proporcionó la variación de secuencia para los 12 loci autosómicos STR en 16 muestras de cannabis. Los resultados revelaron una variación intra-repetición en ocho loci donde el alelo nominal o basado en el tamaño era idéntico, pero se descubrieron variaciones de secuencia. Además, se observó

una concordancia completa entre la MPS y los datos de electroforesis capilar (CE). Este estudio demostró que la tipificación de STRs más informativa de las muestras de cannabis se puede realizar satisfactoriamente en una plataforma MPS.

Palabras Clave

cannabis sativa; ADN forense; botánica forense; secuenciación masiva en paralelo; repeticiones cortas en tándem

Innovation in Molecular Techniques for the Genetic Identification of Cannabis Sativa for Forensic and Intelligence Purposes

Abstract

This article describes the development of a method for genetic identification of *Cannabis sativa* and the association of different cases with forensic and intelligence purposes. First, a STR multiplex of 15 loci was evaluated. The results indicated that this STR system was not suitable for forensic identification. Therefore, a novel 13 loci STR multiplex was developed and optimized for the identification of *C. sativa*. A cannabis reference STR population database with parameters of forensic interest was developed. And finally, a panel was designed for MPS of 12 cannabis-specific STR loci per sequence. The STRait Razor v3 software was used to analyze and extract STR sequence data. The study provided sequence variation for 12 autosomal STR loci in 16 cannabis samples. These results revealed intra-repeat variation at eight loci where the nominal or size-based allele was identical, but the variations were discovered by sequence. Furthermore, a complete concordance was observed between the MPS and the capillary electrophoresis (CE) data. This study demonstrated that the most informative STR typing of cannabis samples can be successfully performed on an MPS platform.

Keywords

cannabis sativa; forensic DNA; forensic plant science; massively parallel sequencing; short tandem repeats

Introducción sobre el uso de cannabis

1. HISTORIA

Cannabis sativa es una planta que se cultiva en todo el mundo para su uso como fibra, medicina o estupefaciente. Aunque no se ha identificado un origen preciso, se ha especulado que el *C. sativa* tiene como origen Asia occidental o central (Piomelli y Russo, 2016; Li, 1974a). La determinación del origen es difícil, porque el cannabis se ha transportado extensivamente durante los últimos 6000 años y se ha establecido en varias áreas fuera de su ubicación original.

Se sabe que el cannabis se ha cultivado durante los últimos 6000 años (Fleming y Clarke, 1998), y se tiene evidencia de que su uso data del año 10.000 a. C. Sin embargo, esto último está basado en muestras arqueológicas en forma de hebras de cáñamo halladas en macetas de arcilla en tumbas que datan del año 10.000 a. C. (Kung, 1952; Chang, 1963). Además, el cannabis puede haber sido cosechado hace 8500 años en China, probablemente de la planta silvestre y no de formas ya domesticadas (Schultes y Hoffmann, 1980). Más tarde, el cáñamo se introdujo en Asia occidental, Egipto y finalmente en Europa entre los años 1000 y 2000 a. C (Small, 1979). En el año 500 d. C., el cultivo en Europa ya estaba muy extendido (Small, 1979). Durante la era de la exploración, el cáñamo se transportó por primera vez hacia América del Sur en 1545 y hacia América del Norte en 1606 (Small, 1979). Durante la mayor parte de su historia,

el cannabis (cáñamo) se ha empleado principalmente por las propiedades características de su fibra, que incluyen resistencia, durabilidad y resistencia al agua (Bócsa y Karus, 1998; Schultes *et. al.*, 1974). Además, las semillas de cannabis se han utilizado como fuente de alimento para el hombre y el ganado por más de 3000 años en China (Schultes, 1973).

En cuanto a sus propiedades medicinales, el cannabis se ha adoptado en la medicina tradicional china, india y tibetana (Schultes, 1970; Li, 1974b; Li, 1978). Los chinos lo han empleado por sus efectos analgésicos, que datan del año 2700 a. C (Li, 1974b). De hecho, se halló una tumba de 2500 años de antigüedad en Xinjiang, China, que contenía cannabis con un alto contenido de THC (Jiang *et al.*, 2006).

La evidencia sugiere que el cannabis se ha utilizado para rituales y ceremonias religiosas en el sur de Asia, especialmente Afganistán e India, incluso antes de la historia escrita (Aldrich, 1977). Para estas ceremonias, el cannabis con alto contenido de tetrahidrocannabinol (THC) se preparaba comúnmente como hachís. El hachís sigue siendo una forma común de consumo de cannabis en Europa y Asia.

2. CULTIVO

2.1 Condiciones de cultivo

C. sativa es una planta anual que se puede cultivar tanto en interiores como en exteriores. En condiciones exteriores, el ciclo de vida de la planta dura aproximadamente de cinco a siete meses. El cultivo al aire libre se ve afectado por factores como el viento, la lluvia, la humedad y la luz solar. El cultivo en interiores permite un mayor control del ciclo vital de la planta, pero el ambiente debe controlarse estrictamente para garantizar un crecimiento óptimo. El cannabis requiere una cantidad y calidad de luz especiales para la fotosíntesis. Los estudios han demostrado que el *C. sativa* se beneficia de la alta densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD). Además, la fotosíntesis depende de la temperatura (25-30° C), la humedad (75%) y los niveles de dióxido de carbono (1600 ppm). (Chandra *et al.*, 2008, 2011).

2.2 Propagación

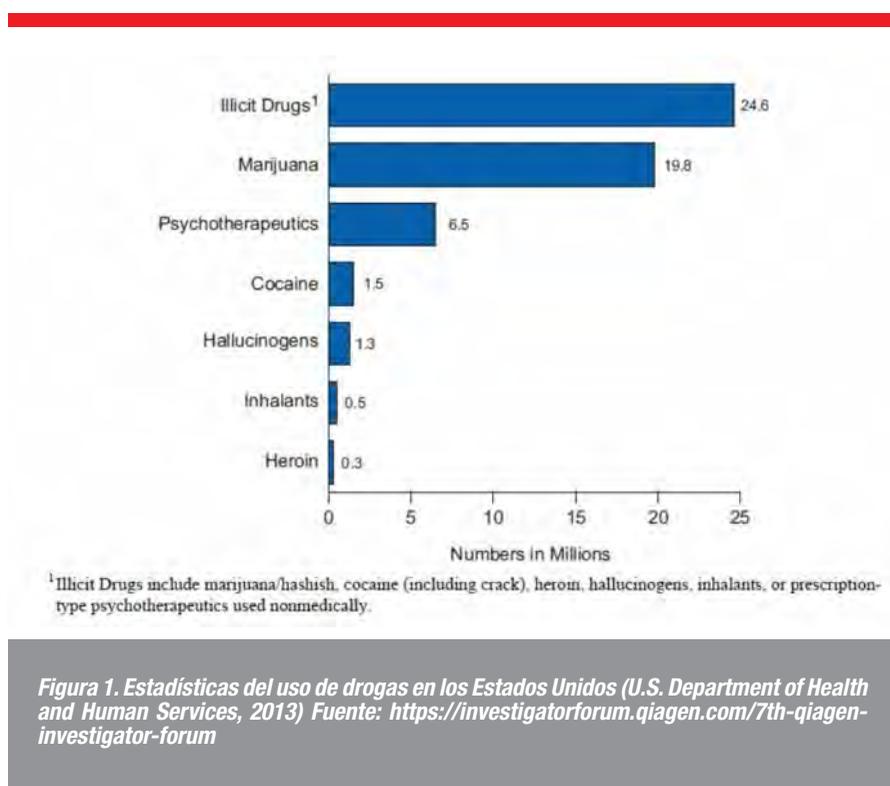
El cannabis se propaga comúnmente a través de semillas o esquejes de plantas. Las semillas se plantan en suelo húmedo y aireado, y la germinación ocurre de dos a siete días. Aunque la propagación de semillas es una técnica convencional, es difícil mantener la calidad y los niveles de THC y cannabidiol (CBD). Cuando crecen a partir de semillas, una fracción importante de las plantas adultas serán masculinas lo que dará como resultado niveles más bajos del cannabinoide deseado (THC o CBD). Como tal, el número de plantas masculinas está estrictamente controlado en la producción de marihuana con fines de venta, debido a la baja concentración de componentes psicoactivos. Se producen genotipos idénticos debido al cultivo mediante propagación de plantas o propagación clonal en lugar de reproducción sexual. La mayoría de los productores y dispensarios prefieren la propagación clonal para mantener una calidad y potencia constantes en sus productos. Para la propagación clonal, los recortes de las plantas femeninas deseadas, que contienen niveles más altos de THC, se enraizan directamente en el suelo o en un medio líquido (hidroponía). La propagación clonal da como resultado plantas genéticamente idénticas, mientras que la propagación de semillas da como resultado plantas con una composición genética variada. En el caso de la propagación clonal, la tipificación del ADN permitirá la vinculación directa de los casos a un productor o distribuidor común.

3. ESTATUS LEGAL ACTUAL EN EE.UU.

3.1 Historia

3.1.1 Ley de Estupefacientes

La marihuana es el estupefaciente de uso más frecuente en los EE. UU. (Figura 1). El uso o posesión de marihuana es ilegal bajo la ley federal en los Estados Unidos según la Ley de Estupefacientes de 1970. En virtud de esta ley, la marihuana se reconoce como una sustancia de la Lista I de estupefacientes, lo que significa que tiene un alto potencial de abuso, no se acepta la seguridad de uso y no se acepta el uso médico. Otras drogas incluidas en el Anexo I son la heroína, psilocibina, peyote, dietilamida del ácido D-lisérgico (LSD), cocaína, etc. El cannabidiol también es una sustancia incluida en la Lista I de estupefacientes como derivado de la marihuana. Actualmente, tres medicamentos cannabinoides (Marinol®, Syndros® y Cesamet®) se pueden recetar legalmente a pacientes por ley federal (por ejemplo, para aliviar los efectos secundarios de quimioterapia, convulsiones, etc.).



3.1.2 Leyes estatales

En EE.UU., a nivel estatal, la legislación es variada y discordante respecto al consumo permitido de cannabis (Figura 2). En 1996, California se convirtió en el primer estado en legalizar el cannabis de uso médico. Actualmente, 29 estados y el Distrito de Columbia tienen leyes que permiten el uso de marihuana medicinal. Además, el uso recreativo de cannabis para personas mayores de 21 años está actualmente permitido en ocho de los 29 estados: Alaska, California, Colorado, Maine, Massachusetts, Nevada, Oregon y Washington, así como en el Distrito de Columbia. Aunque la

ley federal es suprema en el país, el Memorándum Cole en 2013 proporcionó cierta protección contra la aplicación de la ley federal. En enero de 2018, el Fiscal General Jeff Sessions rescindió este memorando haciendo incierto el futuro de los enjuiciamientos federales contra el cannabis.

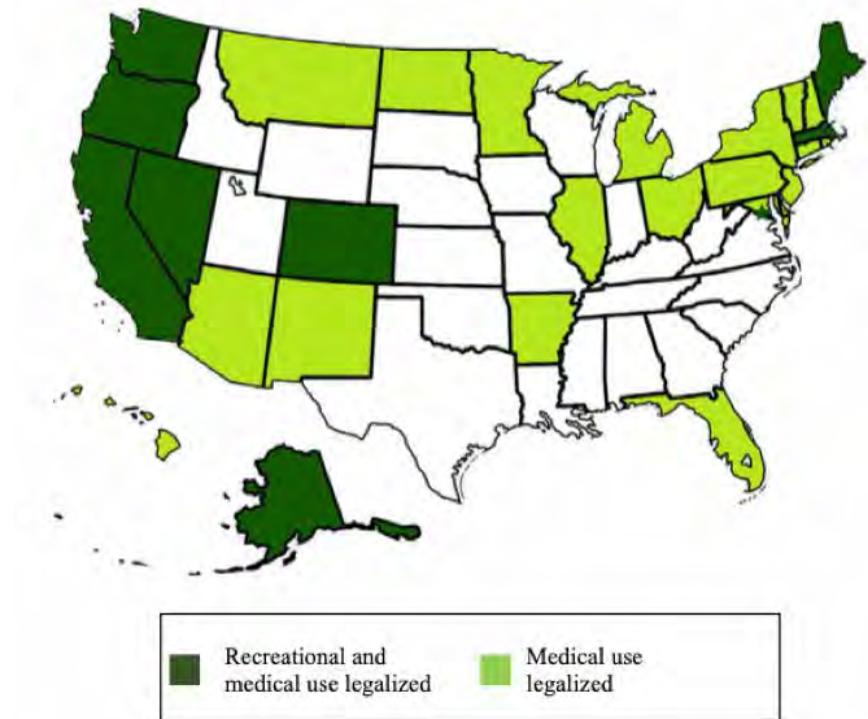


Figura 2. Mapa de los diferentes niveles de legalización del cannabis en los Estados Unidos. En verde oscuro, los estados en los que está legalizado el uso médico y recreativo; en verde claro, solo su uso médico. Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Identificación genética de *Cannabis sativa*

1. ¿QUÉ ES EL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO O ADN?

El ADN, o ácido desoxirribonucleico, es la molécula que contiene la información genética de todo ser vivo, y su nombre viene de su estructura molecular. Cada molécula de ADN está formada por una molécula de azúcar y una de fosfato, a la que se unen unas moléculas llamadas bases, las que están dirigidas al centro de la molécula. El término desoxirribosa se refiere al tipo de azúcar, y el término nucleico, al ácido formado por el fosfato y la base nitrogenada. Estas bases pueden ser de cuatro clases: adenina, citosina, timina y guanina, nombradas generalmente como A, C, T, G. Y el orden en el cual se combinen es lo que codifica la información genética (código genético). El ADN se organiza estructuralmente en cromosomas (Figura 3). A nivel funcional se organiza en genes, que son regiones de ADN que expresan y generan características y funciones físicas

específicas. De esta forma, el ADN se transcribe en moléculas de ARN mensajero (ARNm), para luego ser traducidas en polipéptidos o proteínas. Las características y funciones específicas, antes mencionadas, vienen dadas por la traducción del ARNm en polipéptidos o proteínas.

Esto es lo que da las diferentes características físicas que observamos en individuos, como la raza, color de ojos, estatura, susceptibilidad individual a cierto tipo de enfermedades, etc. (National Genome Research Institute, 2020a).

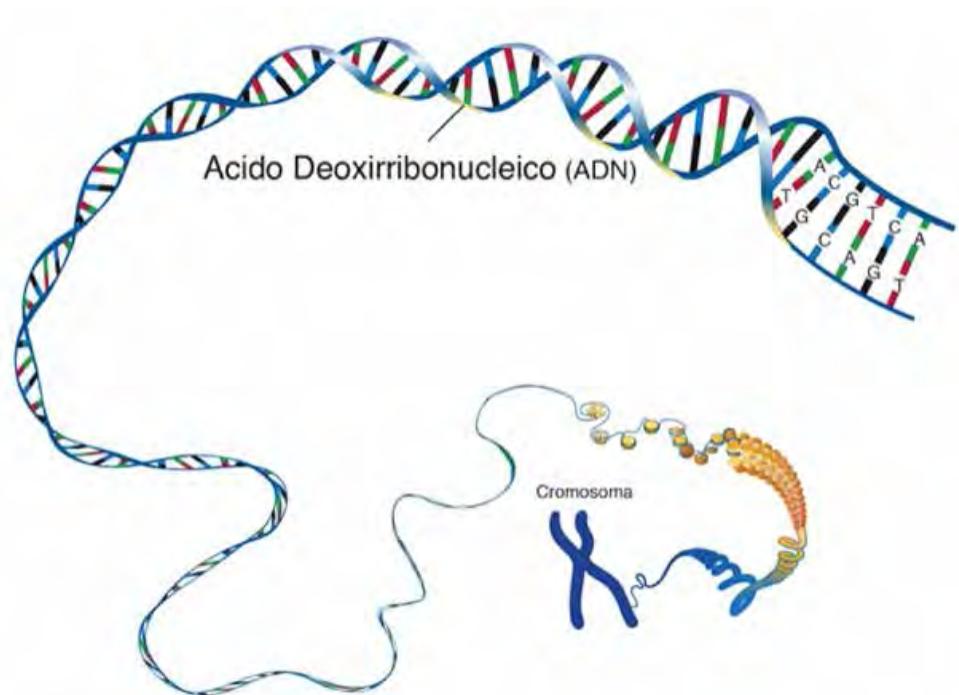


Figura 3. Estructura del ADN. Fuente: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleico>

2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método experimental que sirve para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza fragmentos cortos de ADN llamados *primers* (cebadores) para seleccionar la parte del genoma que va a ser amplificado. La temperatura de la muestra es aumentada y disminuida repetidamente para que la enzima de replicación del ADN (enzima polimerasa) pueda duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con este método se puede producir un millón de copias de la secuencia seleccionada en aproximadamente dos horas (Figura 4) (National Genome Research Institute, 2020b).

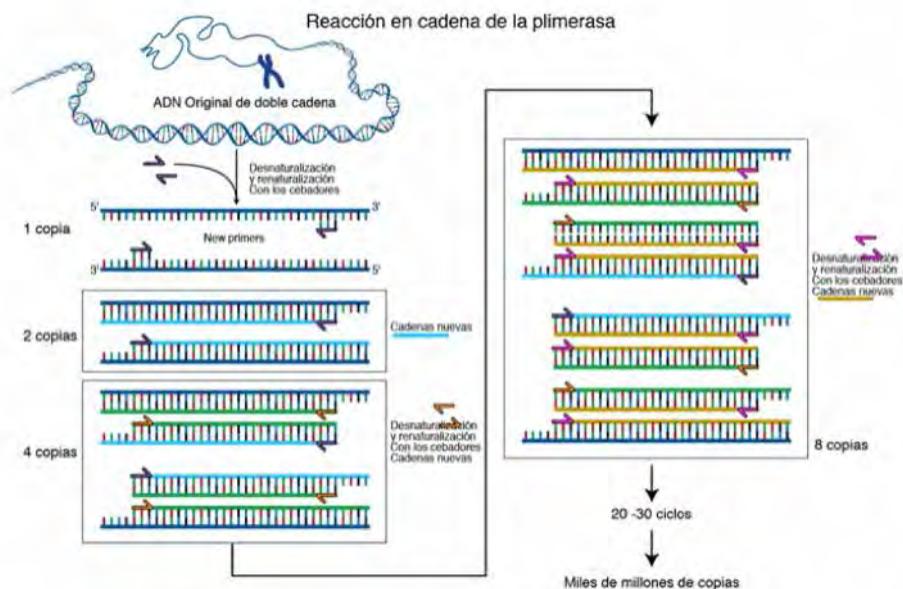


Figura 4. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Fuente: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>

3. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA HUMANA (HID)

Alec J. Jeffreys descubrió el primer locus polimórfico y para hallar este marcador se empleó una sonda de ADN arbitraria, y se detectaron fragmentos de más de 15 longitudes diferentes. Seguidamente, se encontraron otros loci extremadamente polimórficos que constaban de repeticiones en tándem de una secuencia de bases (11 a 60 pb), de forma tal que las diferentes longitudes de los fragmentos originados dependían del número de dichas repeticiones y se las denominó VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). De esta manera, los primeros VNTRs se pudieron aplicar al análisis forense y sustituir a los marcadores clásicos.

En un principio, la cantidad de ADN necesaria era un requisito fundamental para poder emplear estos marcadores. Todas estas limitaciones fueron superadas gracias al descubrimiento de una técnica molecular conocida como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que representó una revolución en muchos campos de la biología y de la medicina. Esta técnica, ideada en 1989 por Kary B. Mullis, que le valió el Premio Nobel de Química en 1993, permitió que se pudieran obtener resultados de muestras biológicas con mínimas cantidades de ADN.

A fin de los años noventa, se desarrollaron nuevos marcadores, las repeticiones cortas en tándem (STRs), y nuevas tecnologías que permitieron acelerar el proceso de análisis de las muestras. A punto tal que el procesamiento de un centenar de perfiles genéticos se podía realizar en solo un par de días. La aparición de los analizadores genéticos automatizados aceleró el proceso

de obtención de resultados. La electroforesis capilar ha sido, durante estos últimos años, la herramienta más utilizada en genética forense.

Durante los últimos años, los grupos de investigación en este campo se han esforzado en descubrir nuevos marcadores, en nuestro genoma, que faciliten la resolución de los casos forenses: marcadores nucleares, ADN mitocondrial, de cromosoma Y y de cromosoma X. En esta línea de investigación, muchos grupos siguen buscando marcadores del tipo SNPs (polimorfismos de un único nucleótido) que nos provean de la información sobre el fenotipo o apariencia externa (color de ojos, color de pelo y color de piel) y la procedencia geográfica de una muestra biológica. También se ha intentado unificar en todas las poblaciones el tipo de marcador utilizado. Y por último, el FBI de Estados Unidos ha desarrollado el sistema CODIS (Combined DNA Index System), que ha permitido crear una base de datos compuesta por los perfiles genéticos de convictos y autores de ciertos delitos que ha ayudado enormemente a resolver un gran número de casos. Las nuevas plataformas de secuenciación, así como los nuevos kits de extracción y purificación de las muestras, junto al desarrollo de plataformas robóticas de extracción, son en este momento las nuevas tecnologías de avanzada. Estas nuevas herramientas permiten un aumento exponencial del número de casos resueltos.

Toda esta experiencia, en el campo de la genética, no solo ha mejorado la resolución de los casos forenses, sino que ha permitido que los grupos de genética forense aborden nuevos campos de investigación, colaborando con otros grupos de distintas disciplinas, ampliando así las fronteras de nuestra comunidad científica (Álvarez-Cubero *et al.*, 2010).

4. REPETICIONES CORTAS EN TÁNDEM (STRS)

Las repeticiones en tándem se refieren a un fenómeno de la secuencia. En verdad, sabemos de qué manera las letras de nuestro genoma se organizan a través de los diferentes cromosomas. Así, para que las repeticiones en tándem ocurran, tenemos que considerar por lo menos dos o más pares de bases, y estos pares de bases se repiten de una manera que puede ser única a los individuos. Debido a esta singularidad, las repeticiones en tándem se pueden utilizar para generar las denominadas “huellas genéticas”. Las repeticiones en tándem tienden a ocurrir en una parte del genoma que no codifica para una proteína, las cuales se definen como regiones de no-codificación (National Genome Research Institute, 2020c).

5. ELECTROFORESIS CAPILAR

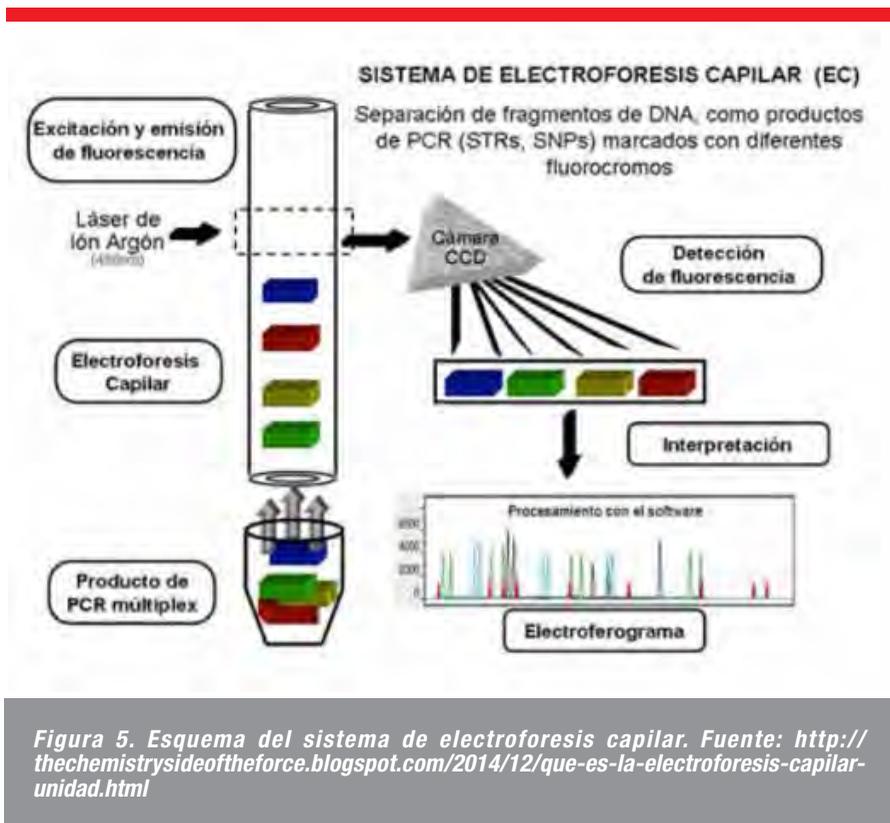
La electroforesis capilar es una técnica analítica de separación que se basa en la diferente velocidad de desplazamiento que tienen las distintas biomoléculas (por ejemplo, el ADN) en el interior de un medio líquido, contenido en un tubo capilar, al someterlas a la acción de un campo eléctrico. Cabe aclarar que la velocidad de migración de estas biomoléculas depende esencialmente de la relación masa/carga que posean al ser sometidas a una diferencia de potencial eléctrico o voltaje.

La separación se lleva a cabo en un tubo capilar, fabricado de sílice fundida, que se llena con el tampón o buffer que constituye el medio de separación (usualmente polímeros líquidos de alta viscosidad de poliacrilamida) a partir de los viales situados en los extremos del capilar.

La muestra, contenida en un vial, se introduce por uno de los extremos del capilar en el momento de la inyección aplicando en él un pequeño voltaje (electro-inyección). El campo eléctrico necesario

para llevar a cabo la separación se consigue conectando una fuente de alimentación de alto voltaje (10.000-30.000 voltios, con corrientes de 5-100 microamperios) a los extremos del capilar de separación a través de los viales de tampón.

El monitoreo de la separación se lleva a cabo en columna, colocando un detector en un punto del capilar de análisis situado generalmente antes del extremo de salida de este. Un ordenador se encarga del control de la instrumentación y de la adquisición y tratamiento de los datos suministrados por el detector (Castagnino, 1999) (Figura 5).



6. SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO (MPS)

La secuenciación masiva en paralelo (MPS) es una técnica de alto rendimiento para la secuenciación de ADN utilizando el concepto de procesamiento masivamente en paralelo, permitiendo obtener información genómica de cientos de miles de moléculas de ADN en un solo ensayo. Algunas de estas tecnologías surgieron entre los años 1994 y 1998 y se empezaron a comercializar a partir del año 2005. Estas tecnologías utilizan plataformas en miniatura (chips) y paralelizadas para la secuenciación de 1 millón a 43 mil millones de lecturas cortas (50-400 bases cada uno) por instrumento.

Muchas plataformas MPS difieren en configuraciones de ingeniería y química de secuencia (Figura 6). Comparten el paradigma técnico de la secuenciación masiva en paralelo a través de fragmentos de ADN amplificados clonalmente separados espacialmente o moléculas de ADN individuales en una celda de flujo. Este diseño es muy diferente del de la secuenciación clásica desarrollada por Sanger, también conocida como secuenciación capilar, que se basa en

la separación electroforética de productos de terminación de cadena producidos en reacciones de secuenciación individuales.

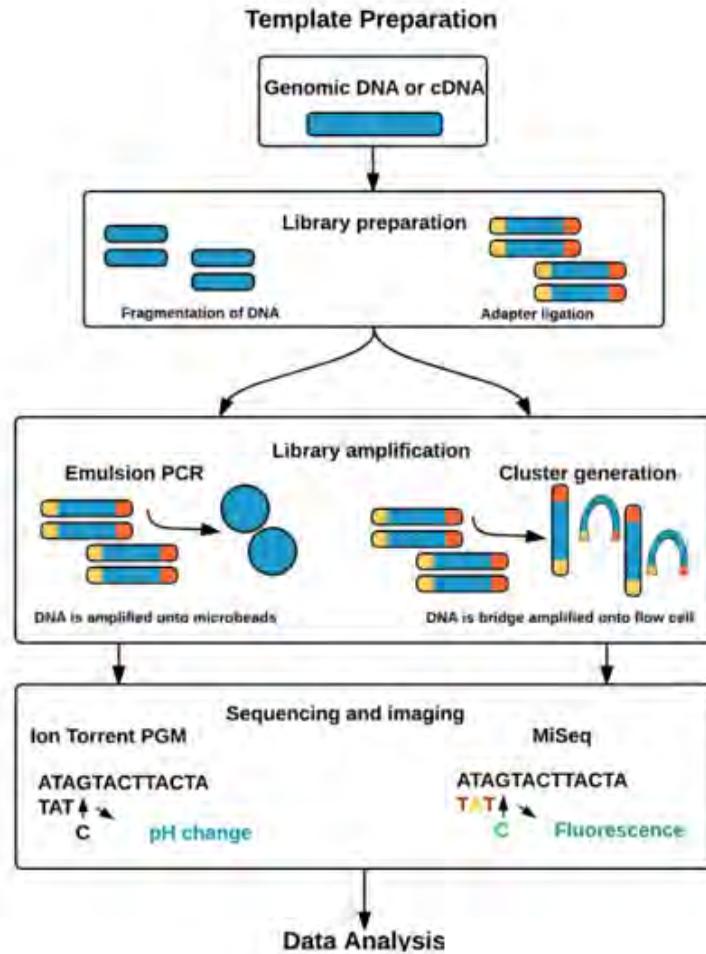


Figura 6. Diagrama de flujo del proceso de secuenciación masiva en paralelo en las dos plataformas más conocidas: Ion torrent PGM (izquierda) e Illumina MiSeq (derecha). Fuente: https://www.researchgate.net/publication/320044302_Who_Is_There_and_What_are_They_Doing_An_Agile_and_Computationally_Efficient_Framework_for_Genome_Discovery_and_Annotation_from_Metagenomic_Big_Data/figures?lo=1

7. DESARROLLO DE LOS MARCADORES STRS DE *CANNABIS SATIVA*

Los marcadores de repetición corta en tándem STRs se definen como secuencias de ADN (de dos a siete bases) que se repiten en tándem (por ejemplo, GAT-GAT-GAT) con tres bases. En la Figura 7, se puede observar un ejemplo de un STR de cuatro bases con 7 repeticiones AATG en un cromosoma y 8 repeticiones en el otro cromosoma del par, para el mismo individuo. En este caso, el perfil genético para este marcador STR es 7,8.

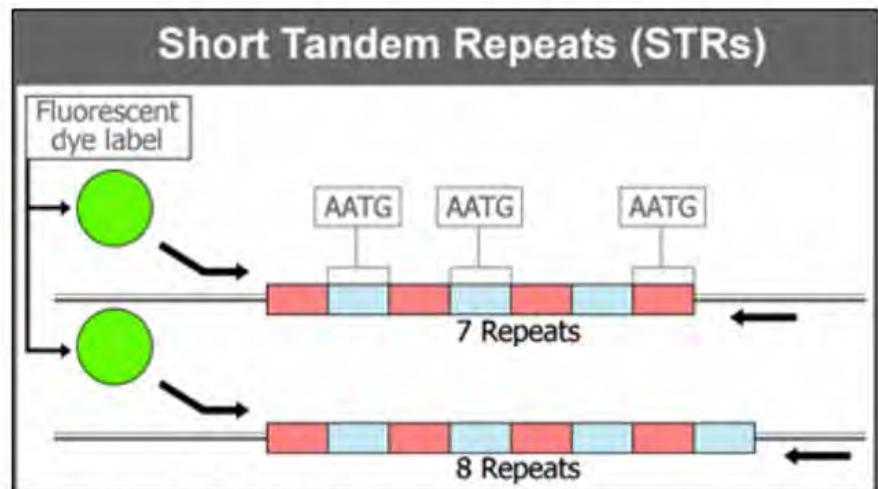


Figura 7. Ejemplo de diferentes estructuras de STRs con un marcador fluorescente. Fuente: <http://rosalind.info/media/microsatpcr2.gif>

Los marcadores de repetición corta en tándem (STR) son el estándar para la identificación genética humana, y análogamente los investigadores se han centrado fundamentalmente en el desarrollo de paneles de STR para identificar plantas de marihuana. Los STRs tienen las ventajas de reproducibilidad, capacidad de amplificarlos simultáneamente y de poseer un alto poder de discriminación.

En 2003, se identificaron varios STRs de cannabis. Se diseñaron 15 marcadores STR: seis con repeticiones de dos bases (ANUCS201, ANUCS202, ANUCS203, ANUCS204, ANUCS205, ANUCS206), ocho con repetición de tres bases (ANUCS301, ANUCS302, ANUCS303, ANUCS304, ANUCS305, ANUCS306, ANUCS307, ANUCS308) y uno con repetición de cinco bases (ANUCS501). La investigación preliminar reveló que los 15 STRs se amplificaron de manera confiable y eran extremadamente variables (Gilmore y Peakall, 2003). Posteriormente, se identificaron 11 STRs adicionales: tres con repeticiones de dos bases (C08-CANN2, H11-CANN1, H09-CANN2) y ocho con repeticiones de tres bases (C11-CANN1, B01-CANN1, D02-CANN2, B02-CANN2, E07-CANN1, B05-CANN1, D02-CANN1, H06-CANN2). Se descubrió que los 11 STRs eran útiles para evaluar la relación genética del material de cannabis incautado (Alghanim y Almirall, 2003). Otro grupo identificó un marcador de repetición de seis bases altamente variable, CS1, con números de repetición que van de tres a 40. Se demostró que CS1 es específico de cannabis y no se observó reacción cruzada cuando se analizaron 20 especies, incluidas *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Humulus japonicus* (lúpulo) (Hsieh *et al.*, 2003).

Se han realizado varios estudios que evaluaron la utilidad de estos marcadores para su aplicación forense. En uno de estos estudios, se evaluaron cinco marcadores (ANUCS201, ANUCS202, ANUCS301, ANUCS302, ANUCS303) de los 15 STR originales y se demostró que los marcadores eran extremadamente variables y podían resultar prometedores para determinar

el origen geográfico y clasificar las muestras de cannabis como droga o fibra (usos ilícito o lícito, respectivamente) (Gilmore *et al.*, 2003). Seguidamente, se desarrolló un sistema STR múltiple con diez STR para la identificación genética de *C. sativa*. Se utilizó una combinación de los diez STRs descriptos originalmente tanto por Gilmore y Peakall como por Alghanim y Almirall para este sistema STR. Los diez STRs se amplificaron en cuatro sistemas múltiples por separado, y se realizó una validación del método de acuerdo con las pautas SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods). Después de la validación, se creó una base de datos STR para las incautaciones de marihuana en Australia. También se observó la presencia de genotipos idénticos en las incautaciones de marihuana en la base de datos de STR australiana y el análisis estadístico demostró que estos genotipos idénticos eran el resultado de la propagación clonal (Howard *et al.*, 2008)

Posteriormente, se desarrolló un sistema múltiple con seis marcadores previamente descriptos (ANUCS303, ANUCS305, E07-CANN1, D02-CANN1, H06-CANN2) amplificados en la misma reacción. El sistema múltiple fue capaz de diferenciar 98 muestras de cannabis con una probabilidad de encontrar el mismo genotipo en una población no relacionada de uno en 9000 aproximadamente. Aunque el sistema múltiple fue suficiente para individualizar las muestras, no fue capaz de diferenciar entre el tipo de droga y el tipo de fibra (Mendoza *et al.*, 2009). El desarrollo de tarjetas de recolección para iniciar una base de datos de ADN de muestras de marihuana en los Estados Unidos utilizando el marcador altamente variable, CS1, demostró la validez y la viabilidad de usar estas tarjetas de recolección de ADN en campo para preservar el ADN del cannabis para futuros análisis. Las muestras incluyeron marihuana fresca, hojas, material seco y hachís. El éxito de la tipificación del ADN fue variable dependiendo del tipo de muestra: con muestras frescas que producían perfiles completos, materiales secos que generaban perfiles parciales y hachís sin producir perfiles. Los resultados demostraron que las tarjetas de recolección de ADN podrían utilizarse con fines de base de datos de marihuana cuando se usa material vegetal fresco (Allgeier *et al.*, 2011). Debido a su especificidad de especie, se demostró que el marcador CS1 también puede usarse para identificar semillas de cannabis. Las semillas de la misma cepa exhibieron perfiles genéticos diferentes mientras mostraban similitudes genéticas generales. Lo más importante, debido a su especificidad de especie, es que esta técnica permite la identificación de cannabis sin tener que cultivar la planta (Shirley *et al.*, 2013).

En 2012, se desarrolló y validó un sistema múltiple STR de 15 marcadores que consta de marcadores previamente descriptos (D02-CANN1, C11-CANN1, H09-CANN2, B01, CANN1, E07-CANN1, ANUCS305, ANUCS308, B05-CANN1, H06-CANN2, ANUCS501, CS1, ANUCS302, B02-CANN2, ANUCS501). Los estudios de validación para el sistema múltiple de STRs incluyeron sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. También encontraron perfiles de ADN idénticos presumiblemente de plantas propagadas clonalmente (Köhnemann *et al.*, 2012)

En un esfuerzo por estandarizar la identificación genética de *C. sativa*, se propuso una nomenclatura para los 15 STR descriptos anteriormente (Valverde *et al.*, 2014). Se secuenciaron los 15 marcadores, notándose variaciones de secuencia dentro de la repetición y las regiones flanqueantes. La nomenclatura propuesta siguió las pautas internacionales estándar. Esta nomenclatura estandarizada para STR es imprescindible para el uso de STRs. La nomenclatura propuesta para siete nuevos marcadores STR se desarrolló de acuerdo con las recomendaciones de ISFG para usar marcadores de repetición de cuatro bases, seis (3735, 9043, 9269, 5159, 4910, 1528) eran repeticiones de 4 bases, mientras que una (nH09) era una repetición de tres bases. El borrador del genoma publicado en 2011 se utilizó para buscar nuevos marcadores

STR mediante el uso de una herramienta de búsqueda para repeticiones en tándem denominada Phobos 3.3.12. El examen inicial reveló 16 marcadores STRs con nueve marcadores descartados debido a su limitada variabilidad o una región flanqueante con demasiada variabilidad para efectuar la amplificación por PCR. Se reportó la nomenclatura para los siete marcadores STR restantes.

Usando una extensa base de datos de 1.324 muestras, se genotipificaron muestras de cannabis de cáñamo y cultivares de drogas. Se utilizaron cinco múltiplex para genotipificar los 13 marcadores STR previamente descritos tanto por Gilmore y Peakall como por Alghanim y Almirall. Los resultados del estudio permitieron describir la firma genética de los cultivares. Sin embargo, los datos se basaron en el tamaño de los productos de PCR y no en alelos, ya que no se utilizó un kit. El análisis filogenético estadístico de genotipos reveló que los marcadores STRs capturaron la diversidad genética de los cultivares (Dufresnes *et al.*, 2017).

A continuación, se evaluó la variabilidad genética de 20 cultivares de *C. sativa* var. indica y dos cultivares de *C. sativa* var. sativa (Soler *et al.*, 2017). La variabilidad se evaluó con seis marcadores de dinucleótidos previamente identificados, y los resultados revelaron 14 grupos genéticos con individuos del mismo cultivar que generalmente se agruparon todos juntos.

Es importante destacar que *C. sativa* var. sativa fue estadísticamente diferenciada de *C. sativa* var. indica. Se observó una gran variación dentro de los cultivares, y Soler señaló que esta variación podría explotarse con fines de reproducción.

Solo se ha reportado un número relativamente pequeño de STRs en cannabis. En un esfuerzo por desarrollar más marcadores STRs, se utilizó el genoma y el transcriptoma publicados en 2011 como un medio para buscar STRs. Se identificaron SSRs (repeticiones de secuencia simple) a partir de marcadores de expresión de secuencia (EST). Esta es una forma rápida y eficiente de identificar los STRs y puede ayudar a dilucidar ciertos rasgos agronómicos en la medida que los EST estén vinculados a los genes. Aunque esto puede ser muy ideal en el campo de la identificación forense, es una forma efectiva de mapear el genoma. Se detectaron posibles STRs de 32.324 secuencias disponibles en NCBI utilizando el software AutoSSR. Posteriormente, se desarrollaron cebadores (*primers*) para 3.442 EST-SSR basados en las secuencias de las regiones flanqueantes. Los datos revelaron que se produce un STR por cada 8,49 kb secuenciados. Además, los resultados demostraron que los trinucleótidos (50,99% de los marcadores) representaban la mayoría de las repeticiones en tándem, siendo AAG / CTT (17,96%) las repeticiones más frecuentemente observadas (Gao *et al.*, 2014). Por el contrario, en otro trabajo se observaron que los dinucleótidos son la clase más común (Alghanim *et al.*, 2003). Esta diferencia puede deberse a los métodos utilizados en el desarrollo de los STRs. Después de la detección aleatoria de los EST-SSR, solo se usaron 56 loci para evaluar la diversidad genética y la relación de 115 variedades de cannabis (cáñamo). El PCoA (análisis estadístico por componentes principales) basada en los 56 loci reveló que los EST-SSR podrían separar las 115 variedades en cuatro grupos distintos basados en su geografía: el norte de China, Europa, China central y el sur de China. Este estudio representó el primer desarrollo a gran escala de marcadores STR en cannabis y descubrió marcadores potenciales que podrían usarse en futuros estudios.

Desarrollo y evaluación de nuevos sistemas de identificación genética de cannabis

1. EVALUACIÓN DE UN SISTEMA MULTIPLEX STR DE 13 LOCI PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *CANNABIS SATIVA*

La marihuana (*C. sativa*) es la droga más utilizada en los Estados Unidos (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2014). El desarrollo de un método validado utilizando repeticiones cortas en tándem (STR) de cannabis podría ayudar en la individualización de las muestras y servir como una herramienta de inteligencia para vincular casos múltiples. Para este propósito, se optimizó y evaluó un método multiplex STR de 13 loci modificado de acuerdo con las pautas de la Sociedad Internacional de Genética Forenses (ISFG) y el Grupo de Trabajo Científico sobre Métodos de Análisis de ADN (SWGDM). Se desarrolló y validó un método de cuantificación de ADN para *C. sativa*, y también se diseñó un kit para tipificar con precisión 199 muestras de cannabis de 11 incautaciones efectuadas por la agencia federal U.S. Customs and Border Protection de los Estados Unidos (CBP). Se generaron perfiles de ADN únicos a partir de 127 muestras que produjeron perfiles STR completos. También se encontraron cuatro genotipos duplicados dentro del mismo caso (probablemente fragmentos de la misma planta). El poder combinado de discriminación de este sistema multilocus es de 1 en 70 millones. La sensibilidad del sistema STR multiplex es de 0.25 ng de ADN. Ninguno de los 13 marcadores STR reaccionó de forma cruzada con ninguna de las especies estudiadas, excepto *Humulus lupulus* (lúpulo) que generó picos inespecíficos.

El análisis filogenético comparativo de 11 casos usando su distancia genética reveló la agrupación de cuatro grupos de casos (Figura 8).

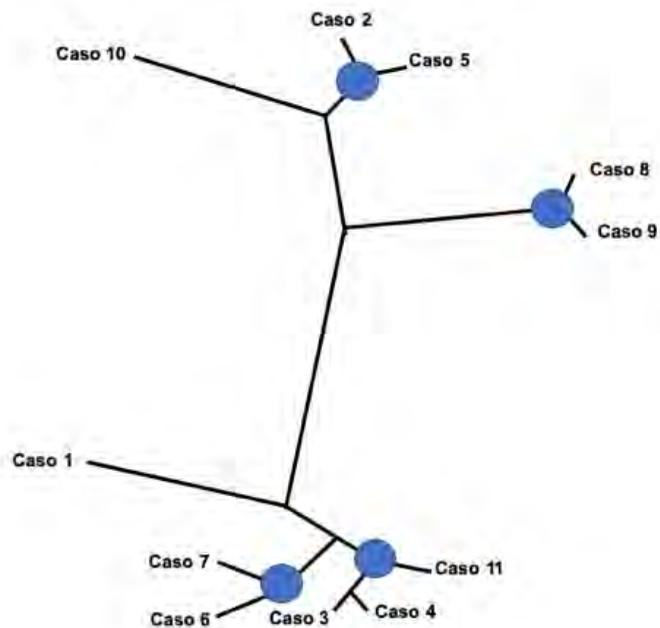


Figura 8. Árbol filogenético que representa las distancias genéticas entre 11 grupos de casos de cannabis (N = 199) incautados en la frontera México-Estados Unidos. Los círculos azules representan los nodos del árbol que indican la asociación de casos analizados: 2-5, 6-7, 8-9 y 3-4-11.

Además, debido a su similitud genética, se descubrió que un subconjunto de muestras (casos 3, 4 y 11; N = 97) formaba una población homogénea constituyendo el descubrimiento de la primera base de datos poblacional de referencia de STRs para cannabis. Los resultados de esta investigación demuestran la aplicabilidad de este sistema STR de 13 loci en la asociación de casos de cannabis con fines de inteligencia (Houston *et al.*, 2016).

2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN INTERNA DE UN NUEVO MÉTODO DE 13 MARCADORES STR PARA LA GENERACIÓN DE PERFILES DE ADN DE *C. SATIVA*

La marihuana (*Cannabis sativa* L.) es una planta cultivada y traficada en todo el mundo como fuente de fibra (cáñamo), pero también de usos medicinal y recreativo. El desarrollo de un método validado utilizando técnicas moleculares como las repeticiones cortas en tándem (STR) podría servir como una herramienta de inteligencia para vincular múltiples casos mediante la individualización genética o la asociación de muestras de cannabis. Para este propósito, se desarrolló, optimizó y validó un método multiplex STR de 13 loci de acuerdo con las pautas vigentes de ISFG y SWGDAM. El STR multiplex consta de 13 STRs de *C. sativa* previamente descritos: ANUCS501, 9269, 4910, 5159, ANUCS305, 9043, B05, 1528, 3735, CS1, D02, C11 y H06 (Figura 9).

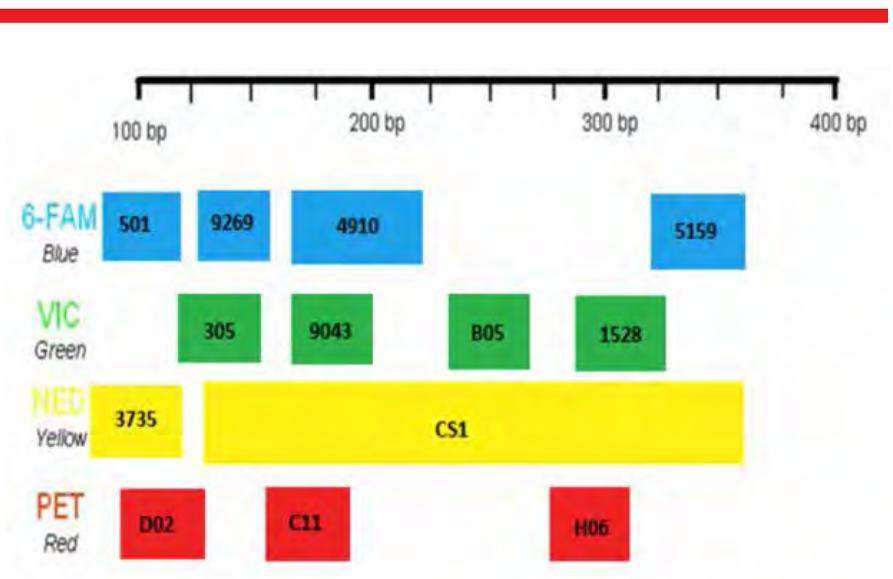


Figura 9. Diagrama de los 13 marcadores STR usando cuatro canales de color con marcadores fluorescentes: 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo). Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Se diseñó un nuevo kit para genotipificar con precisión 101 muestras de *C. sativa* de tres incautaciones proporcionadas por un laboratorio forense perteneciente a la agencia federal U.S. Customs and Border Protection (CBP). Usando un rango óptimo de ADN (0.125-0.5 ng), los estudios de validación revelaron electroferogramas con picos óptimamente balanceados y con artefactos mínimos (Figura 10).

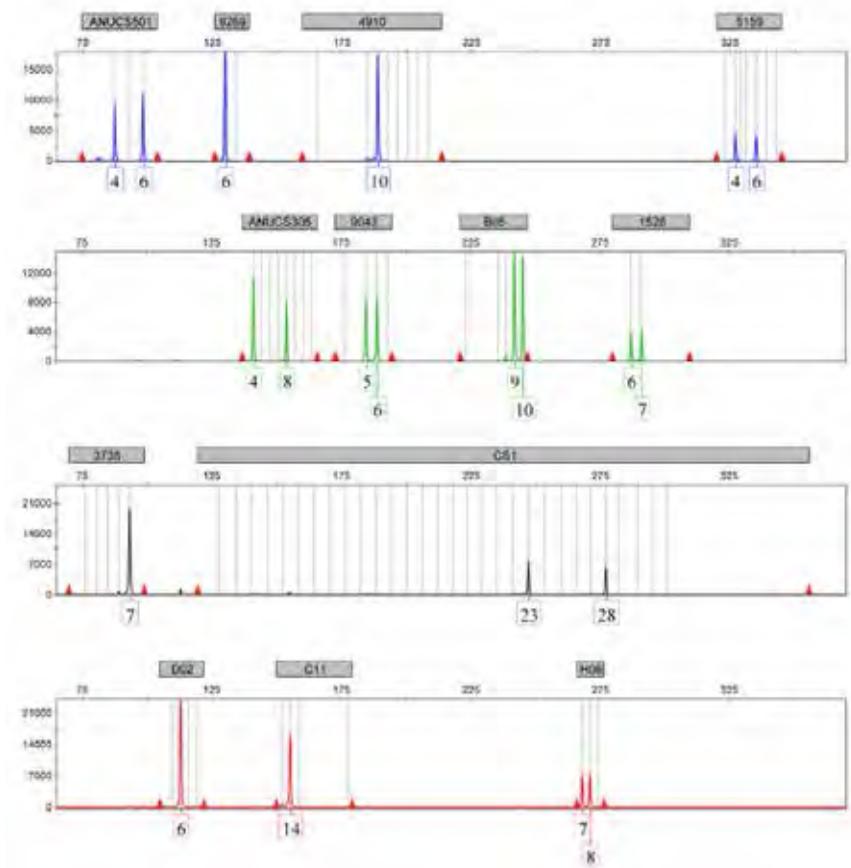


Figura 10. Perfil multiplex de 13 loci STR de cannabis con 0,5 ng de ADN (muestra nro. 1-D1). Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Este sistema multilocus es relativamente sensible (0,13 ng de ADN) (Figura 11) con un poder combinado de discriminación de 1 en 55 millones.

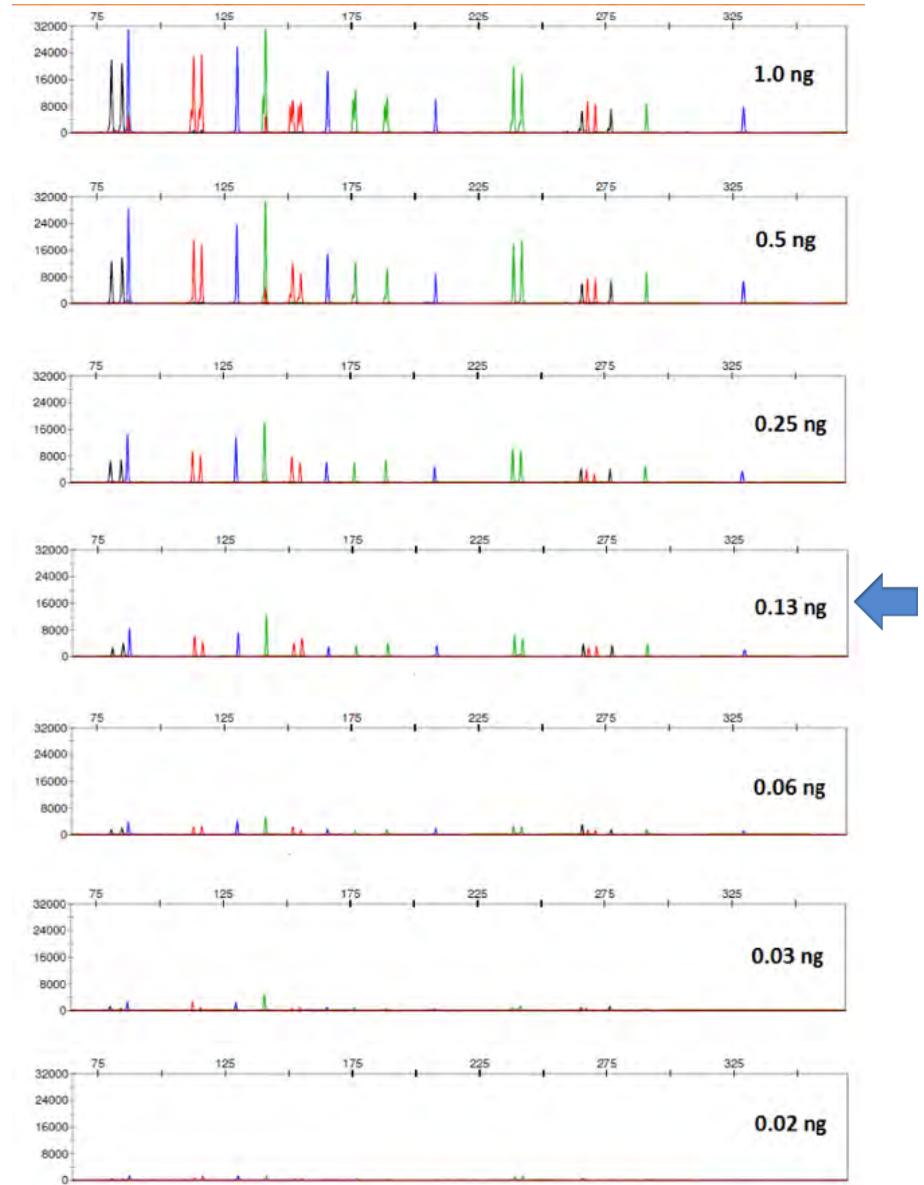


Figura 11. Perfiles de ADN multiplex de 13 loci de cannabis obtenidos de ADN de una misma planta diluida en serie que varía de 1 ng a 0.02 ng para poder determinar su sensibilidad. La flecha indica la mínima cantidad de ADN (0.13 ng) necesaria para poder generar un perfil genético completo. Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-investigator-forum>

Se encontró que el panel 13 STR era específico de la especie para *C. sativa*; sin embargo, se produjeron picos no específicos con *Humulus lupulus* (lúpulo) (Figura 12).

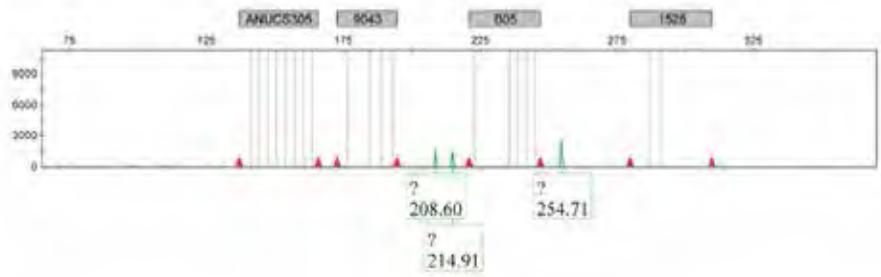


Figura 12. Electroferograma donde se observa la reactividad cruzada de STR de cannabis con lúpulo (*Humulus lupulus*). Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Los resultados de esta investigación demuestran la robustez y la aplicabilidad de este sistema STR de 13 loci para el análisis forense de ADN de muestras de marihuana (Houston *et al.*, 2017). Como la marihuana es el estupefaciente de mayor interés legal en muchas partes del mundo, la capacidad de rastrear el origen biogeográfico del cannabis podría proporcionar a las fuerzas de seguridad pistas de investigación sobre su comercio y distribución. La subestructura de la población y la endogamia pueden hacer que las plantas de cannabis se puedan relacionar genéticamente para su utilización forense, medicinal o con fines de inteligencia. El análisis de ADN permite no solo la predicción del origen biogeográfico de una planta, sino también la discriminación entre plantas individuales.

Adicionalmente se analizaron 510 muestras de cuatro sitios distintos: 21 incautaciones en la frontera entre México y Estados Unidos, el noreste de Brasil, semillas de cáñamo compradas en los Estados Unidos y el área de la Araucanía de Chile. El análisis de ADN resultó en la generación de 356 perfiles únicos a partir de las 425 muestras que produjeron perfiles STR completos y se observaron 25 genotipos idénticos en algunos de los casos. El análisis filogenético de 21 incautaciones en los EE. UU. en la frontera con México reveló la asociación genética de nueve casos que formaron una nueva población de referencia. Se realizó un análisis filogenético de las cuatro poblaciones y los resultados revelaron que los marcadores STR no solo podían discernir la subestructura de la población, sino que también se podía distinguir entre marihuana (estupefaciente) y cáñamo (fibra) que pertenecen a la misma familia de plantas denominada *Cannabaceae* (Figura 13) (Houston *et al.*, 2018a).



Figura 13. Análisis filogenético de distintas muestras provenientes de la frontera EE.UU.-México, Brasil, Chile y cáñamo (hemp) comprado en EE.UU. Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

3. VALIDACIÓN EUROPEA DE UN KIT MULTIPLEX STR DE 13 MARCADORES STR DE *CANNABIS SATIVA* PARA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

La comunidad europea considera ilegales las plantas de *C. sativa*, a pesar de que su consumo es aceptado en ciertos lugares (cafeterías o clubes de cannabis en Holanda y España). Sin embargo, existen diferentes huecos en la legislación de algunos países europeos. Por ejemplo, en Italia, la posesión de “hierba” se despenaliza. Aunque el tráfico y la venta están prohibidos, la posesión de pequeñas cantidades de marihuana se considera solo un delito civil. Para proceder con la evaluación del kit, previamente desarrollado en EE.UU. y la comparación entre laboratorios, el laboratorio forense de Sam Houston State University (SHSU) envió un kit con un control positivo (de genotipo conocido) y muestras incógnito de ADN de cannabis. Las muestras incógnito de ADN se analizaron en distintos laboratorios con diferentes secuenciadores y condiciones de análisis. Los resultados generados por los cuatro laboratorios participantes: Sam Houston State University (EE.UU.), Biogem Scarl (Italia), Università Magna Grecia Catanzaro (Italia) y la Universitat de Barcelona (España) fueron coincidentes (Figura 14).

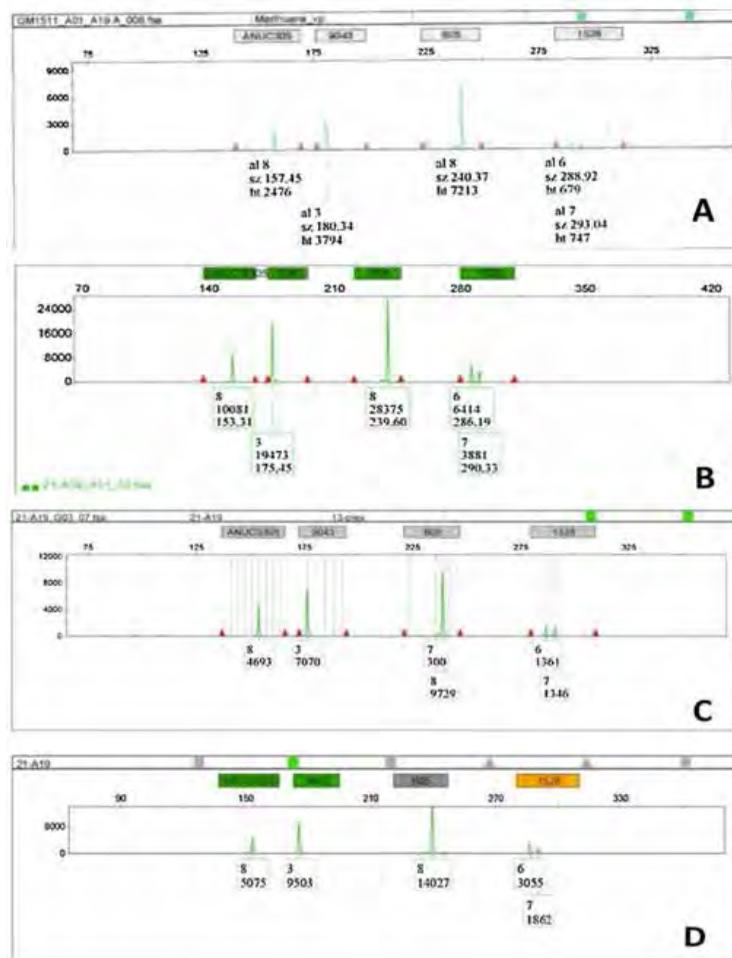


Figura 14. Ejemplos de electroferogramas parciales (marcador fluorescente verde) de los loci ANUCS305, 9043, B05 y 1528, analizados por cuatro laboratorios forenses: Se observó una concordancia completa entre todos los laboratorios: A) Universitat de Barcelona (España); B) Biogem Scarl (Italia); C) Sam Houston State University (Estados Unidos); D) Università Magna Grecia Catanzaro (Italia). Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Esto demostró que el kit STR de 13 marcadores STR para *C. sativa* es lo suficientemente robusto y reproducible y puede ser utilizado con fines de inteligencia para vincular múltiples casos mediante individualización genética o asociación de muestras de cannabis. Además, diferentes pautas de interpretación de datos se están desarrollando a través de un extenso ejercicio de colaboración, entre varios laboratorios ISFG, antes de ser implementado rutinariamente en un laboratorio de genética forense (Di Nunzio *et al.*, 2019)

4. SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO DE STRS EN *C. SATIVA*

La secuenciación masiva en paralelo (MPS) es una tecnología emergente en el campo de la genética forense que proporciona distintas ventajas en comparación con la electroforesis capilar (CE). Este estudio ofrece, como prueba de concepto, que las tecnologías MPS se pueden aplicar a las repeticiones cortas en tándem (STR) en *C. sativa*. Se diseñó un panel personalizado para análisis por MPS para 12 loci STR específicos de cannabis por secuencia, en lugar de tamaño (Figura 15).

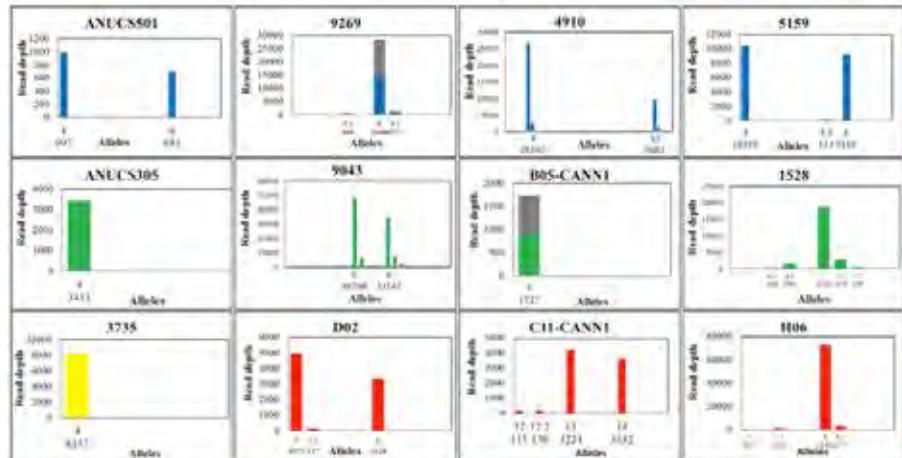


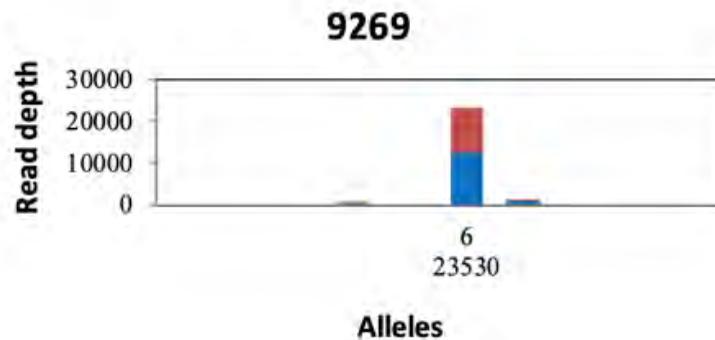
Figura 15. Representación del histograma alelos y profundidad de lectura (o read depth). Los alelos nominales con variaciones de secuencia (como B05) se apilan uno encima del otro con un color diferente que distingue al otro alelo. Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Se implementó una estrategia de trabajo simple y eficiente para integrar el multiplex de PCR personalizado en un flujo de análisis compatible con MPS. Para la clasificación de datos y el análisis de secuencia, se diseñó un archivo de configuración personalizado para el software STRait Razor v3 para analizar y extraer datos de secuencia STR. Este estudio representa una investigación preliminar de la variación de secuencia de 12 loci autosómicos STR en 16 muestras de cannabis de tres países diferentes. Se observó una concordancia completa entre los datos de MPS y CE (Figura 16).



Figura 16. Comparación de métodos de visualización de genotipos STR en plataformas CE (izquierda) y MPS (derecho). En el gráfico MPS, el eje de coordenadas horizontal representa el número de secuencias obtenidas (profundidad de lectura o read depth). Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Los resultados revelaron variación intra-repetición en ocho loci donde el alelo nominal (basado en el tamaño del producto de amplificación) era idéntico (iso-alelo), pero también se descubrieron variaciones en la secuencia de la región flanqueante (Figura 17).



Nominal Allele	String sequence	Read depth
6	CTTTCTATCAGTATCTATAAAATATTTACAAGA AAAGAGCATT [ATCA] [ATAA] ₅	12580
6	CTTTCTATCAGTATCTATAAAATATTTACAAGA AAAGAGCATT [ATAA] ₆	10950

Figura 17. Ejemplo de genotipo previamente clasificado como homocigoto (mismo alelo en ambos cromosomas; en este caso 6,6) pero determinado como heterocigoto (diferentes alelos en ambos cromosomas) por secuencia. Se observa la visualización del histograma de los isoalelos, así como la variación de secuencia entre los dos alelos "6". Fuente: <https://investigatorforum.qiagen.com/7th-qiagen-investigator-forum>

Aunque solo se evaluó un pequeño número de muestras de cannabis, este estudio demuestra que se pueden obtener datos STR más informativos a través de MPS (Houston *et al.*, 2018b).

Conclusiones

El *Cannabis sativa* L. (marihuana) es el estupefaciente más utilizado en los Estados Unidos. Como resultado, es muy traficada hacia y dentro de los Estados Unidos por el crimen organizado. Además, la policía enfrenta un desafío único en el seguimiento y la prevención del flujo de la marihuana legal a los estados donde aún es ilegal. Además, existe un importante tráfico ilegal de *C. sativa* desde México en la frontera de los Estados Unidos. El desarrollo de un método validado utilizando técnicas moleculares como repeticiones cortas en tándem (STR) para la identificación genética de *C. sativa* puede ayudar en la individualización y la determinación del origen de las muestras de cannabis, así como servir como una herramienta de inteligencia para vincular los casos de cannabis (por ejemplo, tráfico ilegal en la frontera México-Estados Unidos). Hasta la fecha, no se ha informado de ningún método de tipificación de ADN para Cannabis utilizando marcadores de repetición corta en tándem (STR) siguiendo las recomendaciones ISFG o SWGDAM. Este trabajo explora la utilidad de las herramientas genéticas forenses para la identificación y determinación del origen de *C. sativa*. Los resultados proporcionan a la comunidad genética forense una herramienta genética integral (STR y MPS) que permite la individualización de muestras de cannabis, la asociación de diferentes casos y la determinación del origen de las muestras con fines forenses y de inteligencia.

Antes de la tipificación de STR, se desarrolló y validó un método de PCR para la cuantificación del ADN del cannabis de acuerdo con las pautas SWGDAM. Se evaluó y modificó un múltiplex STR de 15 loci descrito anteriormente. Además, se desarrolló un kit para la determinación precisa de genotipos. Se determinó que el sistema era específico para cannabis, y su sensibilidad era tan baja como 250 pg. También se estableció una base de datos de población (N = 97 muestras) con fines forenses. Los resultados revelaron que el multiplex no era todavía adecuado para las pruebas forenses debido a dificultades técnicas.

Basado en el multiplex previamente evaluado, se diseñó un novedoso multiplex de 13 marcadores STR. Se utilizaron STR tetranucleótidos descubiertos más recientemente, y se implementó una estrategia más integral para el diseño y la optimización del STR multiplex. Los estudios de validación interna y de desarrollo se realizaron siguiendo las pautas de ISFG y SWGDAM. Se generaron perfiles de ADN de alta calidad con una cantidad de ADN tan baja como 0,13 ng. Los resultados confirman la validez de un sistema multiplex de 13 marcadores STR para la identificación de variantes de cannabis destinado a un uso de análisis forense de ADN cuya robustez sería comparable con los sistemas STR estándar utilizados para identificación genética humana, ya que el multiplex produjo perfiles STR de alta calidad comparables a los sistemas HID comerciales. Dada la solidez de este ensayo, esta tecnología puede ayudar a la comunidad forense a medida que aumenta la demanda de perfiles de cannabis, ya sea con fines de identificación genética o de inteligencia. Sin embargo, se deben establecer pautas apropiadas de interpretación de datos a través de estudios de validación interna antes de la implementación.

Para probar la robustez y la validez de la técnica, se obtuvieron más de 500 muestras de cannabis de cuatro fuentes distintas: frontera entre Estados Unidos y México (N = 21 incautaciones), Chile, Brasil y cáñamo. Las muestras se genotipificaron utilizando STRs. Para la tipificación, se utilizó la cuantificación por PCR en tiempo real previamente validada y el método STR de 13 marcadores. Las comparaciones filogenéticas iniciales revelaron una subpoblación homogénea más grande

que consta de nueve casos ($N = 157$ muestras). Estas muestras formaron una población de referencia que se usó para representar una población homogénea proveniente del tráfico en la frontera entre Estados Unidos y México. Con base en los genotipos obtenidos, se evaluó el análisis filogenético entre la población de referencia de EE.UU., México, Brasil, Chile y muestras de cáñamo. Los marcadores STRs podrían dilucidar la subestructura de la población y pueden ser adecuados para clasificar las muestras de cannabis incautadas. Todos los métodos filogenéticos fueron capaces de distinguir claramente la marihuana del cáñamo.

Además, este estudio presenta, por primera vez, una base de datos de muestras de cannabis de EE.UU. basada en STRs.

Por último, como prueba de concepto, el método STR previamente validado se integró en una plataforma MPS. Es importante destacar que se estableció un diagrama de análisis simple para la secuenciación STR. Para el análisis de secuenciación y el procesamiento bioinformático, se diseñó un archivo de configuración personalizado para STRait Razor v3 para analizar y extraer datos de secuencia STR. Se procesaron dieciséis muestras utilizando la nueva estrategia MPS diseñada, y los resultados revelaron una concordancia completa para el STR basado en el tamaño entre las plataformas MPS y CE. Curiosamente, se observó una variación intra-repetición en ocho loci donde el alelo nominal o basado en el tamaño era idéntico (iso-alelo), pero se descubrieron variaciones de secuencia en la región flanqueante. Dada la exitosa prueba de concepto y el mayor poder de discriminación observado con MPS, la investigación futura se beneficiaría al expandir el número de loci, así como de incluir marcadores de cloroplasto. Como MPS es una plataforma ideal para expandir y evaluar nuevos loci, un único multiplex MPS podría diseñarse para secuenciar cientos de marcadores STR en cientos de muestras simultáneamente.

En resumen, las técnicas y los resultados de esta investigación proporcionan a la comunidad forense una herramienta genética integral (STR y MPS) que permite la individualización de muestras de cannabis y la asociación de diferentes casos con fines forenses y de inteligencia. Debido al constante cambio en las regulaciones legales del consumo de cannabis, los métodos y hallazgos de esta investigación tienen el potencial de expandirse a campos más allá de la ciencia forense, incluida la medicina y la industria comercial.

Abreviaturas

- pb: Pares de bases
- THC: Tetrahidrocannabinol
- CBD: Cannabidiol
- CE: Electroforesis capilar
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- HID: Identificación humana
- ISFG: Sociedad Internacional de Genética Forense
- MPS: Secuenciación masiva en paralelo
- NIST: Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
- PCoA: Análisis de componentes principales
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
- STR: Repetición corta en tándem

SWGDM: Grupo de trabajo científico sobre métodos de análisis de ADN

THC: Tetrahidrocannabinol

Glosario

Locus: Región de ADN específica; a menudo se usa como sinónimo de marcador genético

Loci: Forma plural de locus.

Alelo: Versiones de un gen u otro locus.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Técnica utilizada para amplificar o hacer copias de una región de ADN específica. Se utiliza una polimerasa Taq termoestable para el proceso de replicación junto con cebadores diseñados para amplificar un objetivo específico.

Bibliografía

Aldrich, M.R. (1977). Tantric Cannabis Use in India. *Journal of Psychedelic Drugs* 9, pp. 227- 233. <https://doi.org/10.1080/02791072.1977.10472053>

Alghanim, H. J. y Almirall, J. R. (2003). Development of Microsatellite Markers in *Cannabis sativa* for DNA Typing and Genetic Relatedness Analyses. *Anal Bioanal Chem*, 376, pp. 1225-1233.

Allgeier, L. *et al.* (2011). Field Testing of Collection Cards for *Cannabis sativa* Samples with a Single Hexanucleotide DNA Marker. *Journal of Forensic Science* 56, pp. 1245-1249. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01818.x>

Álvarez-Cubero *et al.* (2010). Nuevas aplicaciones en identificación genética. *Cuadernos de Medicina Forense*, vol. 16, N° 1-2, Málaga.

Bócsa I. y Karus M. (1998). *The Cultivation of Hemp: Botany, Varieties, Cultivation and Harvesting*, Sebastopol, C.A., Hemptech.

Castagnino, J. M. (1999). Electroforesis capilar. *Bioquímica*, vol. 25, N° 1, 98-2000.

Center for Behavioral Health Statistics and Quality (2014). Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: summary of national findings. U.S. Department of Health and Human Services. Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

<https://www.samhsa.gov/data/sites/default/files/NSDUHresultsPDFWHTML2013/Web/NSDUHresults2013.pdf> (Último acceso septiembre de 2020).

Chandra, S. *et al.* (2008). Photosynthetic Response of *Cannabis sativa* L. to Variations in Photosynthetic Photon Flux Densities, Temperature and CO₂ Conditions. *Physiol and Mol Biol of Plants* 14, pp. 299-306. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0027-x>

Chandra, S. *et al.* (2011). Temperature Response of Photosynthesis in Different Drug and Fiber Varieties of *Cannabis sativa* L. *Physiol and Mol Biol of Plants* 17, pp. 297-303. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0068-4>

Chang, K.C. (1963). *The Archaeology of Ancient China*. New Haven: Yale University Press.

Di Nunzio, M. *et al.* (2019). European Validation of a Cannabis Sativa 13-Locus STR Multiplex Kit for Genetic Identification: A preliminary Study. *Forensic Science International: Genetic Supplements Series*, vol. 7, N° 1, pp. 224-226.

Dufresnes, C. *et al.* (2017). Broad-scale Genetic Diversity of *Cannabis* for Forensic Applications. *PLoS ONE*, vol. 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170522>

Fleming, M.P. y Clarke, R. (1998). Physical Evidence for the Antiquity of *Cannabis sativa* L. *Journal of Int Hemp Association* 5, pp. 80-93.

Gao, C. *et al.* (2014). Diversity Analysis in *Cannabis sativa* Based on Large-Scale Development of Expressed Sequence Tag-Derived Simple Sequence Repeat Markers. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110638>

Gilmore, S. *et al.* (2003). Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Sci Int* 131, pp. 65-74. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(02\)00397-3](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(02)00397-3)

Gilmore, S. y Peakall, R. (2003). Isolation of microsatellite markers in *Cannabis sativa* L. (marijuana). *Molecular Ecology Notes*, vol. 3, N° 1, pp. 105-107. DOI 10.1046/j.1471-8286.2003.00367.x

Houston R *et al.* (2016). Evaluation of a 13-loci STR multiplex system for *Cannabis sativa* genetic identification. *Int J Legal Med.*, 130(3), pp. 635-47. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1296-x>

Houston R *et al.*, (2017) Developmental and Internal Validation of a Novel 13 Loci STR Multiplex Method for *Cannabis Sativa* DNA Profiling. *Leg Med (Tokyo)*. 26:33-40. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.03.001>

Houston, R. *et al.* (2018a). Nuclear, chloroplast, and mitochondrial data of a US cannabis DNA database. *International Journal of Legal Medicine* 132(3), pp. 713-725. Erratum en: *Int J Legal Med.* 12, 2018.

Houston, R. *et al.* (2018b). Massive parallel sequencing of 12 autosomal STRs in *Cannabis sativa*. *Electrophoresis*, 39(22), pp. 2906-2911. <https://doi.org/10.1002/elps.201800152>

Howard, C. *et al.* (2008). Developmental validation of a Cannabis Sativa STR multiplex system for forensic analysis. *Journal of Forensic Science* 53, pp. 1061-1067. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00792.x>

Hsieh, H-M. *et al.* (2003). A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa*. *Forensic Sci Int* 131, pp. 53-58. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00395-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00395-X)

Jiang, H.E. *et al.* (2006). A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old yanghai tombs, Xinjiang, China. *Journal of Ethnopharmacology* 108, pp. 414-422. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.034>

Köhnemann, S. *et al.* (2012). The validation of a 15 STR multiplex PCR for cannabis species. *Int Journal of Legal Medicine* 126, pp. 601-606.

Kung, C.T. (1952). *Archaeology in China*. Toronto: University of Toronto Press.

Li, H.L. (1974a). The Origin and Use of Cannabis in Eastern Asia; Their Linguistic-Cultural Implications. *Econ Bot* 28, pp. 293-301. <https://doi.org/10.1007/bf02861426>

Li, H.L. (1974b). An Archaeological and Historical Account of *Cannabis* in China. *Economic Botany* 28(4), pp. 437-448.

Li, H.L. (1978). Hallucinogenic Plants in Chinese Herbals. *Journal of Psychedelic Drugs* 10, pp. 17-26. <https://doi.org/10.1080/02791072.1978.10471863>

Mendoza M.A. *et al.* (2009). Genetic Individualization of *Cannabis sativa* by a Short Tandem Repeat Multiplex System. *Analytical and bioanalytical chemistry* 393, pp. 719-726. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2500-3>

National Genome Research Institute (2020a). <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-acido-Desoxirribonucleico>

National Genome Research Institute (2020b). <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>

National Genome Research Institute (2020c). <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Repeticion-en-tandem>

Piomelli, D. y Russo, E.B. (2016). The *Cannabis sativa* versus *Cannabis indica* Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. *Cannabis and Cannabinoid Research* 1, pp. 44-46. <https://doi.org/10.1089/can.2015.29003.ebr>

Shirley, N. *et al.* (2013). Analysis of the NMI01 Marker for a Population Database of *Cannabis* seeds. *Journal of Forensic Science* 58, N° S1, pp. 76-182. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12005>

Schultes, R.E. (1970). *Random Thoughts and Queries on the Botany of Cannabis*. London: J. & A. Churchill.

Schultes, R.E. (1973). *Man and Marijuana: Thousands of Years Before It Became the Superstar of the Drug Culture; Cannabis Was Cultivated for Fiber, Food, and Medicine*. Nueva York: American Museum of Natural History.

Schultes, R.E. *et al.* (1974). *Cannabis: an Example of Taxonomic Neglect*. *Botanical Museum Leaflets*, Harvard University 23, pp. 337-367.

Schulte, R. y Hofmann, A. (1980). *The Botany and Chemistry of Hallucinogens*. Springfield, IL., Charles C. Thomas Editor.

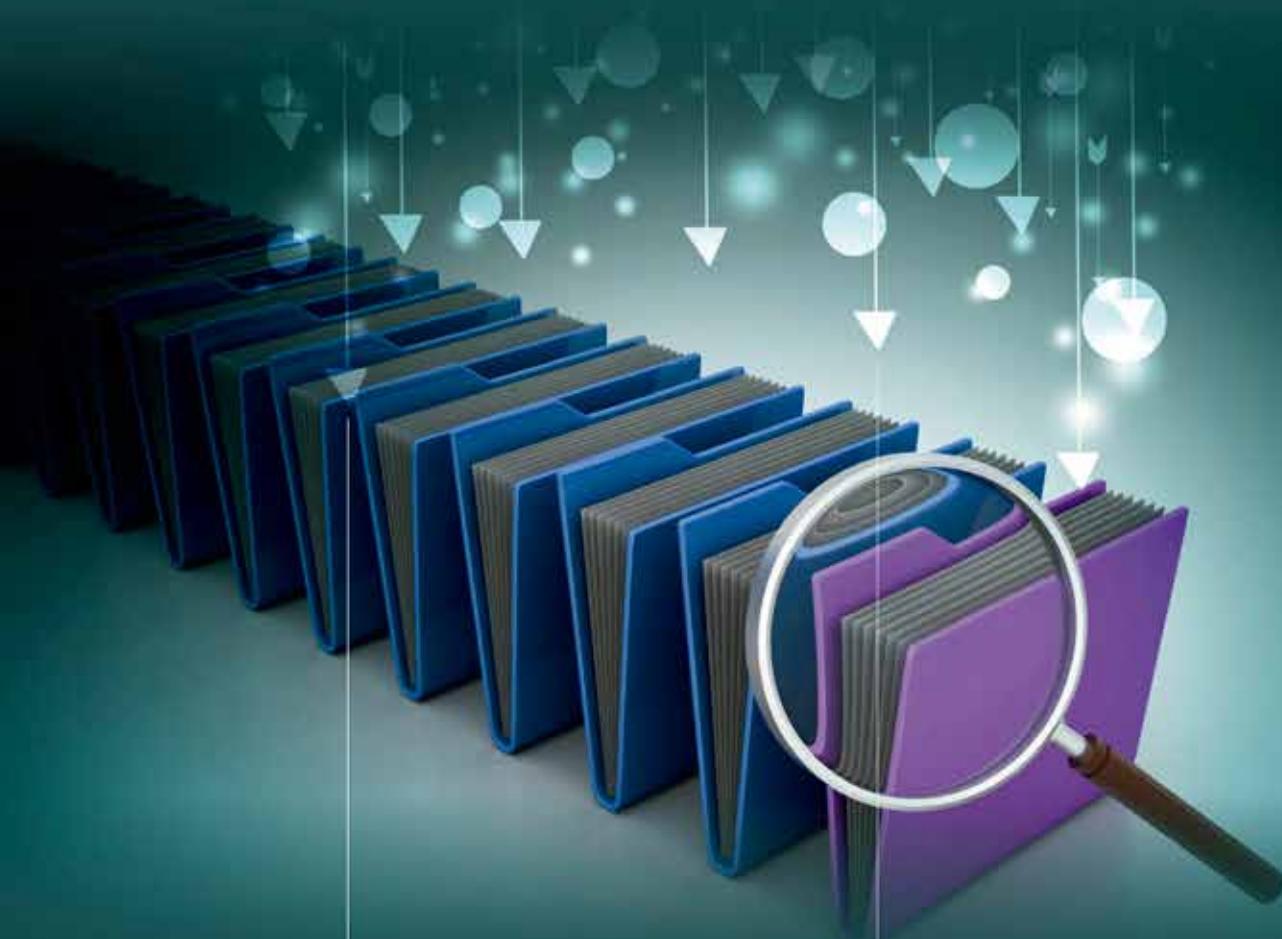
Small, E. (1979). The Species Problem in *Cannabis*: Science and Semantics. vol. 2. Toronto: Corpus Information Services.

Soler, S. *et al.* (2017). Genetic Structure of *Cannabis sativa* var. *indica* Cultivars Based on Genomic SSR (gSSR) Markers: Implications for Breeding and Germplasm Management. *Industrial Crops and Products* 104, pp. 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.043>

Valverde, L. *et al.* (2014). Characterization of 15 STR Cannabis loci: Nomenclature Proposal and SNPSTR Haplotypes. *Forensic Science International Genetics* 9, pp. 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.11.001>

* Este artículo es una síntesis de la tesis doctoral presentada en el Departamento de Ciencias Forenses de Sam Houston State University, Huntsville, Texas, Estados Unidos de América (2018); y del trabajo predoctoral de tesis de la Universitat de Barcelona (2019).

Secretaría de Investigación y Desarrollo



- Cursos
- Talleres
- Tutorías

- Proyectos de investigación
- Publicaciones
- Artículos
- Escritura científica