



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MÉTODO PARA LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN EN
RESTOS ÓSEOS HUMANOS, PARA EL ESTUDIO DE LOS
POLIMORFISMOS, MEDIANTE EL KIT DE AMPLIFICACIÓN
IDENTIFILER (16 STR)**

**TESIS QUE PARA ÓBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA**

PRESENTA:

GABRIELA PÉREZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M.C ROGELIO MAXIL TIRSO

ASESOR DE TESIS:

M. en C. EULALIA DOLORES BAUTISTA ESPAÑA

ASESOR TÉCNICO:

DRA. ALEIDY PATRICIO MARTÍNEZ



JULIO 2022

DEDICATORIA.

Especialmente y con mucho cariño para mis padres, Trinidad Pérez de Ita † y Atala Sánchez Sánchez, para agradecer y honrar todos los sacrificios que han hecho para mí, gracias por recorrer conmigo parte del camino, por su apoyo infinito, su cariño incondicional durante toda una vida, por creer en mí, por alentarme y siempre tener palabras de consuelo, no conozco a nadie en este mundo a quienes les deba más amor y agradecimiento, sepan que estos logros también son suyos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, por brindarme una vida llena de felicidad, aprendizajes, experiencias, oportunidades, a él le debo todo lo que soy y todo lo que algún día seré.

A mis hermanos Concepción, Martín, Carmen y a la familia de cada uno de ustedes, gracias por todo su cariño por ser parte importante de mi vida, por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación, por sus palabras tan acertadas en cada momento, por el aprecio que me demuestran ante su presencia y por llenar mi vida de amor y felicidad cuando estamos juntos.

A mi compañero de vida J. Roberto C.C, por ser una parte importante en mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, gracias por tanto amor, por darme ese empuje cuando lo necesitaba, por su paciencia, cuidados, ánimos, por creer en mí y por todo lo que hemos compartido.

A la Fiscalía General del Estado de Puebla en particular al Instituto de Ciencias Forenses encabezado por el Dr. Francisco Escobar Valdez por abrirme sus puertas en el laboratorio de Genética Forense por todo el apoyo y facilidades de brindarme la oportunidad de hacer posible el desarrollo de este trabajo, así como crecer profesionalmente y aprender nuevas cosas.

Agradezco muy especial a mis directores y asesores de tesis M.C Rogelio Maxil Tirso, M. en C. Eulalia Dolores Bautista España y la Dra. Aleidy Patricio Martínez por la confianza depositada en mi para desarrollar este trabajo tan importante, por sus enseñanzas, consejos, amistad, por su apoyo y dedicación, su hospitalidad y por el valioso tiempo dedicado a revisiones, mil gracias por todo.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por abrirme sus puertas y brindarme los conocimientos en mi formación profesional, es un honor formar parte de esta institución.

Finalmente es muy grato contar con el apoyo de mi comisión revisora la Dra. Lorena Milflores Flores y la Maestra Adriana Ramírez Vargas por su valioso tiempo dedicado, por sus consejos, correcciones y aportaciones.

“Lo que con mucho trabajo se obtiene, más se ama”

Aristóteles

ÍNDICE

Resumen	i
----------------------	----------

Introducción

1. Generalidades	1
1.2 Estructura del ADN.	2
1.3 Genoma Humano, ADN codificante y no codificante.....	4
1.4 Marcadores de ADN.	6
1.5 Polimorfismos analizados STR (short tandem repeats o repeticiones cortas en tándem).....	9
1.6 Amelogenina: marcador del sexo.	13
2. Muestras óseas.	14
2.1 Fisiología del sistema óseo.	15
2.2 Aspecto macroscópico de un hueso largo.	15
2.3 Histología.	17
2.4 Composición del hueso.	18
2.5 Tejidos del hueso.	18
3. Métodos de extracción.....	19
3.1 Métodos de extracción en hueso.	20

Antecedentes	23
---------------------------	-----------

Justificación	35
----------------------------	-----------

Hipótesis	36
------------------------	-----------

Objetivos

7.1 Objetivo general.	37
----------------------------	----

7.2 Objetivos particulares.	37
Esquema de trabajo	38
Material y Métodos	
9.1 Selección de muestras.	39
9.2 Métodos.	39
9.2.1 Pre-procesamiento del hueso.	39
9.2.2 Extracción y purificación de ácidos nucleicos.	40
9.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.	41
9.2.4 Amplificación de los productos de extracción mediante PCR.	42
9.2.5 Electroforesis capilar.	43
Resultados	44
Discusión	63
Conclusiones	65
Bibliografía	66
Anexos	69
14.1 Anexo 1: Reactivos.	69
14.2 Anexo 2: Preparación de Reactivos.	70

Lista de figuras, tablas, gráficas y abreviaturas

En la redacción de este trabajo se incluye las siguientes figuras, tablas, gráficas y abreviaturas:

NO. DE FIGURA	NOMBRE DE LA FIGURA	PAG
1	Organización del ADN nuclear.	2
2	Modelo estructural del ADN.	4
3	Esquema de un gen	8
4	VNTR (Variable Number Tandem repeat o número variable de repeticiones en tándem)	10
5	Uso de los marcadores STR´s para la identificación humana.	12
6	Estructura general de un hueso largo.	17
7	Material biológico de estudio 1.	51
8	Material biológico de estudio 2.	52
9	Material biológico de estudio 3.	53
10	Material biológico de estudio 4.	54
11	Representación de la prioridad de la selección de huesos.	55

12	Electroforesis de los productos de extracción por la técnica fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.	56
13	Perfil obtenido por la técnica fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.	60
14	Perfil obtenido por la técnica fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.	61

NO. DE TABLA	NOMBRE DE LAS TABLAS	PAG
1	Diferentes métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos.	22
2	Parámetros cualitativos de la cantidad de muestra a amplificar.	42
3	Muestras analizadas.	45
4	Características de las muestras analizadas.	47
5	Muestras depositadas en el gel de agarosa.	57

NO. DE GRÁFICA	NOMBRE DE LAS GRAFICAS	PAG
1	Sexo.	62
2	Porcentaje de perfiles completos y parciales.	62

En la redacción de este trabajo se incluye las siguientes abreviaturas:

A	Adenina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADN-mt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
C	Citocina.
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid (Tetra-acetato de etilendiamino).
G	Guanina.
g	gramos.
HCl	Ácido clorhídrico.
h	Hora.
M	Molaridad.
min	Minutos.
ml	Mililitros.
mg	Miligramos.
µg	Microgramos.
mM	Milimolar.
µl	Microlitros.
NaCl	Cloruro de sodio.
ng	nanogramo.
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).
pb	Pares de bases.
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción).

rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Sodio Duodecil Sulfato.
STRs	Short Tandem Repeats (Secuencias repetidas en tándem).
T	Timina.
TBE	Tris-Borato-EDTA.
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat (Numero variable de repeticiones en tándem).

RESUMEN

El presente trabajo se enfocó en un método alternativo para la Extracción y Purificación de ADN en restos óseos humanos, mediante el kit de amplificación Identifiler (16 STR), con el objetivo principal de obtener perfiles genéticos completos con los marcadores moleculares analizados en el Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General del Estado de Puebla.

Las muestras óseas son consideradas críticas en Genética Forense, debido a las variables intrínsecas y extrínsecas, como tipo de hueso, antigüedad, edad cronológica y condiciones ambientales.

Cabe señalar que para este trabajo se utilizaron 38 huesos humanos, todos ellos se trataron bajo el mismo tren de lavado, molienda y descalcificación. La extracción se realizó con la técnica orgánica "*Fenol-Cloroformo*", consecutivamente se purificó con microcones Microcon-100 y a continuación se visualizó la integridad y presencia de ADN, mediante una electroforesis con geles de agarosa al 1 %.

La amplificación del ADN se efectuó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando el Kit AmpFeSTR Identifiler y posteriormente la postamplificación para el análisis de muestras en el instrumento ABI prisma 310 Genetic Analyzer, en el cual se realiza una electroforesis capilar, tomando 1.5 µl de producto de PCR, agregando formamida y Liz 500.

Los marcadores moleculares analizados fueron: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, Amelogenina (que revelará el sexo), D5S818 y FGA. Los datos se procesaron a través del software GeneScan y Genotyper 2.5 obteniendo así un perfil genético completo.

Del total de huesos analizados, en 25 muestras se obtuvo un perfil genético completo, el resto fueron perfiles parciales y otros sin obtención de ningún resultado, esto

puede deberse a las condiciones ambientales bajo las cuales estuvieron expuestas, como ser el único ejemplar y la poca cantidad de muestra que presento para trabajar.

Además, se observó que, en los huesos largos, se consiguió mejores resultados para la obtención de un perfil completo. En orden de mayor éxito de obtención de perfiles genéticos se tiene al fémur, húmero y costilla.

Introducción

1. Generalidades

La Genética es la ciencia de la herencia y de la variación, esta disciplina abarca el estudio del ADN de los organismos biológicos, los individuos pluricelulares y unicelulares, sus descendientes y las poblaciones en que viven, utilizando muchos enfoques experimentales distintos (Alonso, 2004).

Es así como esta misma información genética no sólo está jugando un papel importante en la evolución, sino también su expresión influye en el funcionamiento de los individuos a todos niveles. Por ello, la Genética unifica el estudio de la Biología y tiene un impacto profundo en la actividad humana; una de estas actividades es el campo de las Ciencias Forenses.

La Genética Forense es la ciencia que estudia la aplicación de las técnicas de Biología Molecular para la identificación de los individuos, utilizando regiones del ADN, que presentan variabilidad llamada polimorfismos (Lorente, 2007).

Esta trascendencia social de la tecnología del ADN en la identificación humana, la convierte en una prueba eficaz contra la delincuencia llegando a individualizar a una persona, ya que no existen dos personas con la misma huella genética, a excepción de los gemelos idénticos. Es decir que esas diferencias en la secuencia del ADN entre los individuos constituyen el fundamento científico para identificarlos y establecer la relación de parentesco biológico entre ellos (Lorente, 2004).

Por consiguiente, el ser humano se ha involucrado en el conocimiento de la estructura del ADN, la cual ha sido utilizado como una herramienta fundamental en la resolución de casos forenses entre los que se encuentran: la localización de personas desaparecidas, la vinculación de una persona con algún hecho delictivo y el establecimiento de relaciones de parentesco, son algunas de las situaciones que han

sido resueltas por la Genética Forense a través del uso de perfiles genéticos (Butler, 2011).

1.2 Estructura del ADN.

La célula es la unidad de vida, en ella se encuentra almacenada toda la información genética ubicada en su núcleo y contenida en el ácido desoxirribonucleico (ADN) necesario para la correcta función de la misma (Butler, 2011). Este se encuentra compactado en cromosomas, que son estructuras muy densas de ADN y proteínas denominadas histonas (Figura 1), en él hay cuatro bases: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C), las dos primeras son purinas y las últimas pirimidinas, mientras que las porciones de fosfato y azúcar forman la estructura principal de la molécula de ADN (Figura 2) (Rangel, 2010).

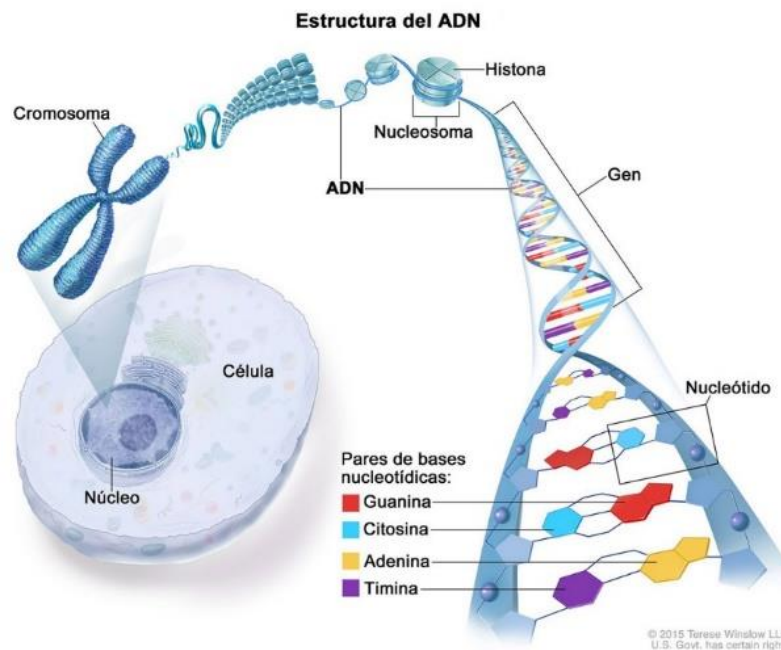


Figura 1. Organización del ADN nuclear. El ADN se encuentra dividido y compactado en cromosomas, los cuales durante las divisiones celulares se organizan en cromatinas que están constituidas de ADN asociadas a proteínas llamadas histonas, observando también la composición y la estructura del ADN (Winslow, 2018).

En 1953, Watson y Crick propusieron el modelo de la estructura del ADN como una doble hélice, que gira sobre si y que contiene información hereditaria codificada, del cual hacen mención que el ADN tiene dos propósitos principales:

1. Hacer copias de sí mismo para que las células puedan dividirse y llevar la misma información, "*replicación del ADN*".
2. Llevar instrucciones sobre cómo hacer proteínas para que las células puedan construir y mantener la maquinaria de la vida, "*traducción del ADN*" (Butler, 2011).

Más aún, estas estructuras forman dos cadenas que están unidas mediante un proceso conocido como *hibridación*. Y una de las características más importantes del ADN es la complementariedad de las bases, a través de enlaces por puente de hidrógeno (Butler, 2011).

La adenina (A) puede aparearse solamente con la timina (T) y presenta dos enlaces de hidrógeno entre el par. Por el contrario, la guanina (G) sólo se puede aparear con la citosina (C) y presenta tres enlaces de hidrógeno entre el par (Figura 2) (Butler, 2011).

Las bases nitrogenadas o nucleobases producen las diversas diferencias biológicas entre los seres humanos y todas las criaturas vivientes que constituyen la base de toda la herencia y la evolución.

Las dos cadenas de ADN que forman la doble hélice presentan un fenómeno de "emparejamiento de bases" y son "antiparalelas", es decir, una cadena está en la orientación 5' a 3' y la otra cadena se alinea en la dirección 3' a 5' (Rangel, 2010).

La secuencia complementaria de la primera cadena puede determinarse fácilmente con base a las reglas de emparejamiento base de A con T y G con C (Figura 2) (Butler, 2011).

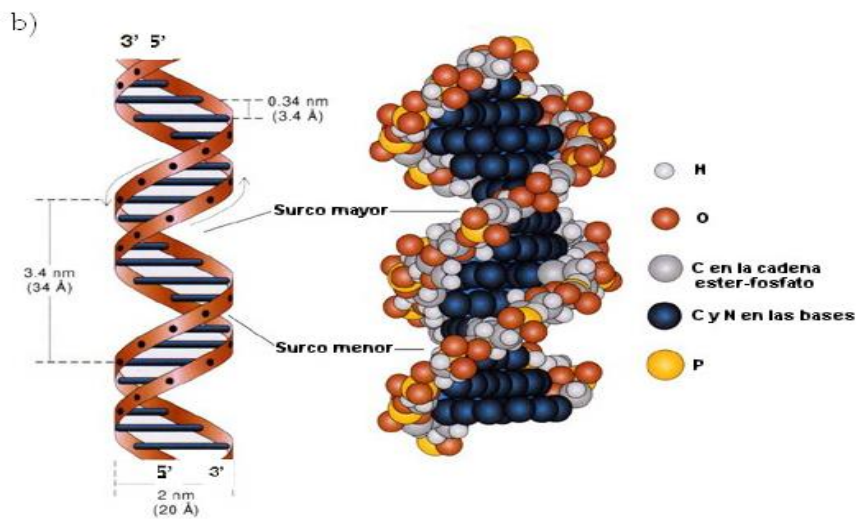
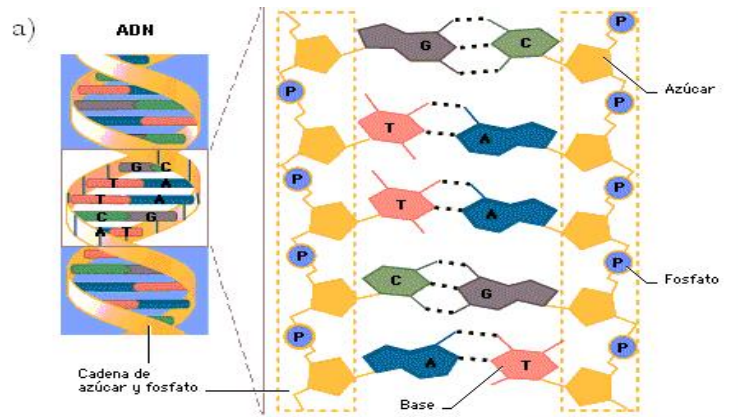


Figura 2. Modelo estructural del ADN. Estructura de doble hélice de ADN (ácido desoxirribonucleico) en el cual se observa la sucesión polimérica de cada una de las bases nucleotídicas así como los grupos fosfatos, las pentosas y bases nitrogenadas y su interacción por puentes de hidrogeno con sus partes complementarias (a), la doble hélice del ADN unido por dos cadenas antiparalelas observándose sus surcos (mayor y menor) con un modelo tridimensional de las moléculas de hidrógeno, oxígeno, carbono nitrógeno y fosfato (b) (Rangel, 2010).

1.3 Genoma Humano, ADN codificante y no codificante.

En relación con la información codificada dentro de la propia estructura del ADN, que se transmite de generación en generación, es la dotación completa de material genético que recibimos de nuestros padres y se le denomina Genoma Humano (Rangel, 2010).

Esta dotación consiste en 22 pares de cromosomas autosómicos y dos cromosomas que determinan el sexo conocidos como gonosomas, esta información genética se localiza dentro del núcleo de las células humanas y se organiza en dos genomas:

El gran genoma nuclear de herencia compartida por ambos progenitores (ADN nuclear, el principal y más importante, que forma los cromosomas) y el pequeño genoma mitocondrial (ADN mitocondrial) que transmiten exclusivamente las madres en sus óvulos, ambos son de interés en el campo de la identificación humana y se describen sus características más importantes a continuación:

ADN nuclear.

- Se localiza en el núcleo.
- Se encuentra asociado a ciertas proteínas formando unas estructuras denominadas cromosomas.
- Los cromosomas pueden verse al microscopio en el núcleo de las células en división.

ADN mitocondrial.

- Cada mitocondria presenta diversas copias del material genético.
- Presenta una conformación circular.
- Mide un poco menos de 17,000 pb.
- Aproximadamente 37 genes.
- Es heredado de la madre.
- Es más estable que el ADN nuclear
- Se analizan dos regiones hipervariables (Alonso, 2004).

Cabe destacar que de esta información que constituye el genoma, solo una parte se “expresa” (ADN codificante o ADN informativo) que contiene la información genética en los genes, cuya secuencia nucleotídica codifica para una proteína, también llevan la información necesaria para fabricar moléculas de ARN (ribosomal y de transferencia) que intervienen en el proceso de síntesis de proteínas (Figura 1) (Rangel, 2010).

El ADN codificante es poco polimórfico, en otros términos, tiene poca variación estructural, con alguna excepción, por lo que carece de interés en ciencias forenses con fines de identificación humana (Lorente, 2004).

Los genes constan de *exones* (porciones que codifican para proteínas) e *intrones* (las secuencias intermedias). Los genes sólo constituyen el 5% del ADN genómico humano. Las regiones de ADN que no codifican proteínas, pero forman del resto de nuestro material cromosómico, tienen una función reguladora o simplemente estructural (Butler, 2011).

Por otra parte, el ADN que representa la fracción mayoritaria del genoma nuclear, está compuesto en gran parte de secuencias de ADN repetitivo sin una función clara y que se suele denominar “ADN no codificante” en el sentido que no codifica información para la síntesis de proteínas (Butler, 2011). Es precisamente una fracción de este ADN el que más interés tiene en Genética Forense, ya que se trata de regiones de ADN que no revelan características fenotípicas de los individuos y es donde se concentra la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos, pues sus *mutaciones* no están sometidas a una selección tan fuerte como las que ocurren en el ADN codificante (Alonso, 2004).

1.4 Marcadores de ADN.

Los marcadores moleculares, son regiones del ADN, que poseen una ubicación física e identificable en un cromosoma, cuya herencia se consigue rastrear y puede ser un gen o alguna sección del ADN sin función conocida, dado que los segmentos de ADN que se encuentran cerca en un cromosoma tienden a heredarse juntos (Rangel, 2010).

Los polimorfismos detectados en el ADN se deben a diferencias al número de determinadas regiones no codificantes dispersas en el genoma (regiones repetidas) o a mutaciones puntuales.

Polimorfismo significa literalmente «muchas formas». Así pues, el polimorfismo genético, cromosómico o de secuencia del ADN es el responsable de la gran variabilidad

existente entre los individuos de una misma especie. La diversidad del genoma entre especies es obvia, mientras que la diversidad del genoma dentro de una misma especie hace que cada individuo sea único e irrepetible (Olivia, 2002).

En función de estas características se pueden clasificar los diferentes métodos de detección de polimorfismos:

- los marcadores que detectan cambios puntuales en el genoma; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism o Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), RADP (Random Amplification of Polymorphic DNA o Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism o Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), SNP (Single Nucleotide Polymorphism o Polimorfismos de nucleótido simple), etc., que pueden ser detectables o no, por enzimas de restricción.
- los marcadores asociados a variaciones debidas al número de repeticiones en su secuencia (microsatélites y minisatélites) (Butler, 2011).

Inicialmente el descubrimiento de las enzimas de restricción permitió el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción. Posteriormente, con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se desarrollaron nuevos métodos de detección de marcadores moleculares (Prieto, 2004).

Por lo que estos marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen. La mayoría de las pruebas de identidad humana se realizan utilizando marcadores en los cromosomas autosómicos y la determinación del sexo se realiza con marcadores en los cromosomas sexuales (Butler, 2011).

Los marcadores usados para la prueba de identidad humana se encuentran en las regiones no codificantes, ya sea entre los genes o dentro de los genes (es decir, intrones) y, por lo tanto, nos informan sobre la variación genética (Figura 3) (Butler, 2011).

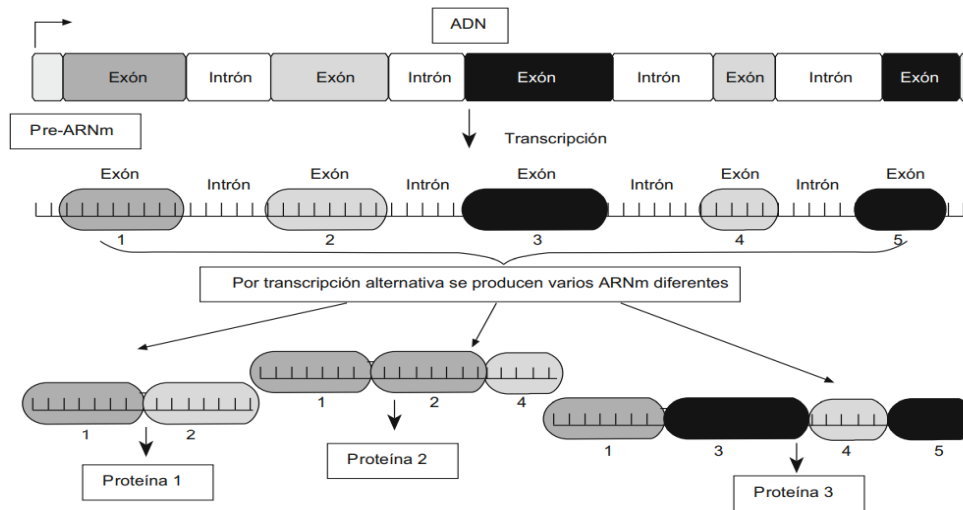


Figura 3. Esquema de un gen. Estructura simple concebida como secuencia de ADN constituida por exones e intrones. Los exones pueden ser unidos en diferentes combinaciones formándose ARNm maduro con mensajes genéticos diferentes (Martínez, 2010).

Sin embargo, los marcadores polimórficos (variables) que difieren entre los individuos se pueden encontrar en todas las regiones no codificadoras del genoma humano. Así por ejemplo la posición cromosómica o la ubicación de un gen o un marcador de ADN en una región se denomina comúnmente locus (plural: loci) (Butler, 2011).

Los pares de cromosomas que se describen como *homólogos* son de un mismo tamaño y contienen la misma estructura genética. Esto es una copia de cada gen del cual reside en la misma posición (locus) en cada cromosoma del par homólogo, pero pueden presentar posibilidades alternativas.

Las posibilidades alternativas para un gen o locus genético se denominan alelos. Si los dos alelos en un locus genético en cromosomas homólogos son diferentes, se denominan *heterocigotos* y si los alelos son idénticos en un locus particular, se denominan *homocigotos* (Butler, 2011).

En consecuencia, por cada par de cromosomas, uno de ellos es heredado por la madre del individuo y el otro por el padre, no obstante, estas secuencias de ADN para cada cromosoma en el par homólogo pueden ser idéntica o no (Butler, 2011).

Por consiguiente, las diferencias detectables en los alelos en los loci correspondientes son esenciales para las pruebas de identidad humana. Un perfil de ADN es la combinación de genotipos obtenidos para múltiples loci. El tipado de ADN o el perfil de ADN es el proceso de determinar el genotipo presente en ubicaciones específicas a lo largo de la molécula de ADN (Butler, 2011).

1.5 Polimorfismos analizados STR (short tandem repeats o repeticiones cortas en tándem).

A medida que la Biología Molecular fue investigando y descubriendo los secretos del ADN, se encontró que a veces aparecían tramos cortos de ADN humano que variaban de una persona a otra. Es decir, el ADN humano no era totalmente igual en todas las personas, existían zonas que eran polimórficas pues variaban en su secuencia (Lorente, 2004).

Esta diversidad es la responsable de fenómenos a gran escala como la evolución de las especies y de otros de trascendencia menor —pero no menos importantes— como las características diferenciales entre individuos de una misma especie. Los polimorfismos pueden encontrarse en las regiones codificantes del genoma (regiones que codifican para una proteína), recibiendo el nombre de «polimorfismos génicos».

También podemos encontrarlos en las regiones no codificantes (regiones que no codifican para ningún producto génico, pero que pueden tener una función reguladora o simplemente estructural); entonces reciben el nombre de «polimorfismos genéticos» (Olivia, 2002).

Estos polimorfismos genéticos permiten distinguir un individuo de otro individuo. Por lo tanto, el ADN no codificante no está sujeto a presión selectiva intensa, por lo que admite unos niveles de variación de secuencia muy grandes (Prieto, 2004).

Los genomas eucariotas están llenos de secuencias repetidas de ADN, estas repeticiones de las secuencias de ADN vienen en todos los tamaños y se designan típicamente por la longitud de la repetición y el número de unidades de repetición

contiguas o la longitud total de la región de repeticiones, las unidades de repetición largas pueden contener varios cientos de bases en la repetición (Lewontin, 2001). Estas regiones se denominan a menudo ADN satélite y se encuentra en las regiones heterocromáticas, principalmente en torno al centrómero y en los telómeros. Se ha sugerido que ayudan a estabilizar al y tendrían un rol en el control del envejecimiento celular. El término satélite surgió debido al hecho de que frecuentemente se observaron uno o más “bandas satelitales” menores (Figura 4).

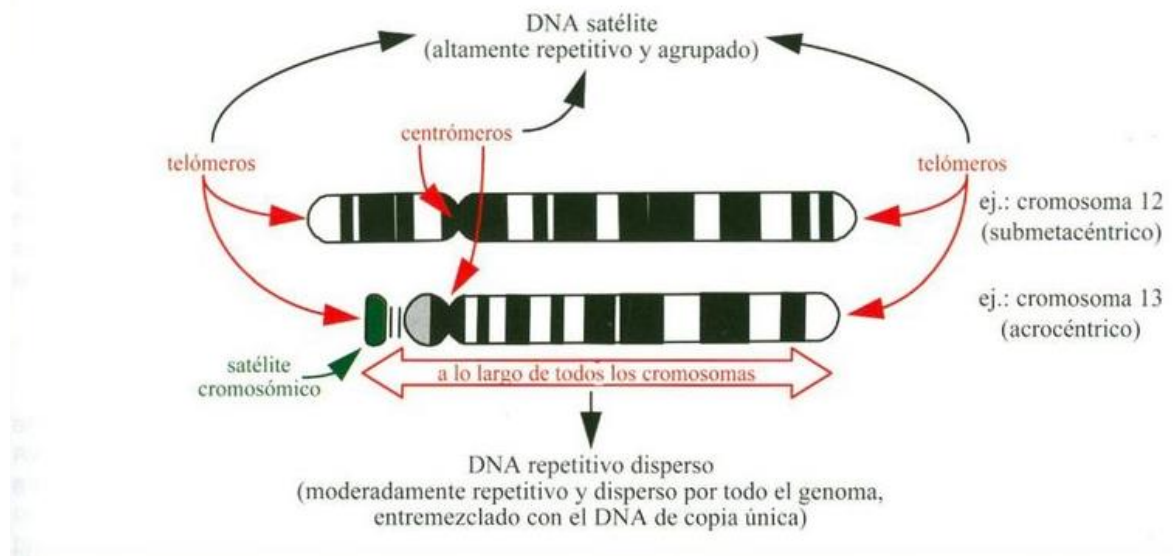


Figura 4. VNTR (Variable Number Tandem repeat o número variable de repeticiones en tándem. Se muestran en los cromosomas 12 y 13 las bandas de ADN satélite distribuidas a lo largo de los cromosomas de forma repetitiva o dispersa (Garrido, 2017)

Asimismo, la unidad de repetición de núcleo para una repetición de longitud media, a veces denominada minisatélite o un VNTR (Variable Number Tandem repeat o número variable de repeticiones en tándem), están en el intervalo de aproximadamente 8 a 100 pares de bases (pb) de longitud (Lewontin, 2001).

Las regiones de ADN con unidades repetidas que tienen una longitud de 2 pb a 7 pb se denominan microsatélites SSR (Simple Sequence Repeat o más frecuentemente repeticiones en tándem cortas STR's). Con todo esto uno de los enfoques principales para realizar la tipificación de ADN se puede clasificar en métodos de polimorfismo de

longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Butler, 2011).

Los métodos basados en PCR han superado rápidamente al RFLP. Los marcadores de ADN forense más recientes y probablemente más rápidamente aceptados son las repeticiones cortas en tándem (STR) debido a una serie de ventajas (Butler, 2011).

Estos marcadores se han vuelto populares para la tipificación de ADN forense porque están basados en PCR y funcionan con plantillas de ADN de baja cantidad. Los métodos de tipado STR son susceptibles de automatización e involucran la detección sensible de fluorescentes, que permite a los científicos recoger datos rápidamente de estos marcadores.

Es precisamente el número de veces que se repite de esta unidad de secuencia lo que presenta una gran variabilidad entre los individuos de una población. De aquí que estas regiones como se mencionó anteriormente se les denomine “STR” (del inglés: “Short Tandem Repeats”: “pequeñas repeticiones en tándem”). Por ejemplo, si ATTC se repite 2 veces quedaría de la siguiente manera: ATTCATTC (Alonso *et al.*, 2004).

Un perfil de ADN se genera obteniendo los genotipos de varios STRs, formando un código único (6/9, 12/16, 17/21, 22/23, etc.). Hay que señalar que la nomenclatura de cada STR puede ser diferente, Figura 5 (Rangel, 2010).

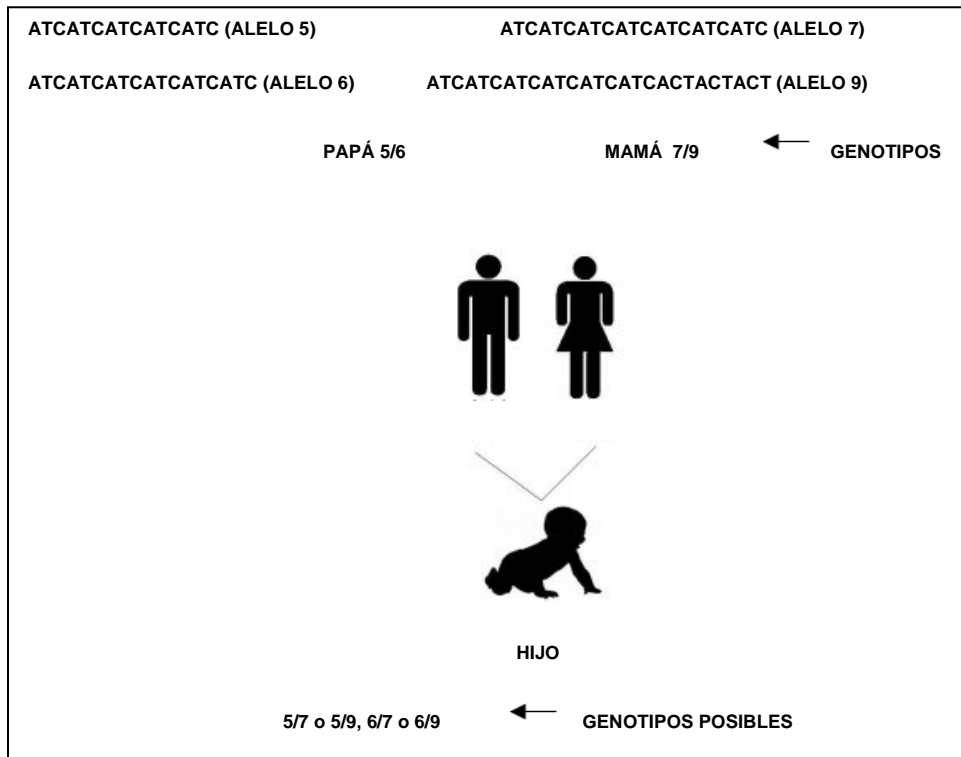


Figura 5: Uso de los marcadores STRS para la identificación humana. Los genotipos permiten establecer relaciones de parentesco y diferenciar a un individuo de otro. De una pareja de homocigotos se generan múltiples genotipos en sus hijos (Rangel, 2010).

En la tipificación de ADN, se examinan múltiples marcadores o loci. Cuantos más marcadores de ADN se examinen y se comparen, mayores serán la probabilidad de individualización.

Los polimorfismos más utilizados en este momento en los laboratorios de Genética Forense son los STR tetraméricos de autosomas y de cromosoma Y, ambos forman parte de ADN nuclear. Por otro lado, se estudia el ADN mitocondrial, concretamente la región más estudiada es la conocida como región de control del ADN mitocondrial (ADNmt) (Butler, 2011).

El ADNmt posee características que lo hacen muy interesante y útil en los estudios forenses y de filiación humana. El número de mitocondrias, aunque variable dependiendo del tipo celular y del estado funcional en que se encuentran oscila entre las 100 y las 1000 por célula, lo que incrementa la probabilidad de que algunas de ellas se conserven

integradas en el tiempo sin verse afectadas por los procesos de degradación (Lewontin, 2001).

Tradicionalmente se ha considerado que el ADN mitocondrial humano se hereda sólo por vía materna. Según esta concepción, cuando un espermatozoide fecunda un óvulo penetra el núcleo y su cola junto con sus mitocondrias son destruidos en el ovulo materno. Por lo tanto, en el desarrollo del cigoto sólo intervendrían las mitocondrias contenidas en el óvulo (Lewontin, 2001).

Este hecho permite estudiar individuos que aun no estando relacionados directamente comparten un ancestro por vía materna ya que la secuencia del ADNmt es idéntica para todos los familiares maternos, salvo que existen mutaciones, permitiendo inferir una relación de parentesco de cadáveres ascendientes o descendientes (por vía materna) así como los estudios de parentesco entre individuos (Lewontin, 2001).

1.6 Amelogenina: marcador del sexo.

La amelogenina es usada frecuentemente en análisis forense para determinar el sexo de una persona, el locus de la amelogenina está localizado en una región homóloga de los cromosomas sexuales. Existe una diferencia de 6 pares de bases entre el tamaño del alelo presente en el cromosoma X con relación al cromosoma Y.

El cromosoma X porta numerosos genes, en tanto el cromosoma Y tan solo unos pocos y la mayoría en relación con la masculinidad. El cromosoma X es común para ambos sexos, pero solo el hombre posee cromosoma Y (Prieto, 2004).

El cromosoma Y es heredado exclusivamente por la vía paterna, transmitiéndose de padre a hijos varones. En análisis del cromosoma Y se ha extendido en los estudios de evolución humana para trazar linajes paternos. El uso de marcadores específicos del cromosoma Y aumenta las posibilidades de detectar pequeñas cantidades de ADN masculino.

Estos marcadores han demostrado también su utilidad en casos de mezclas complejas y en estudios de filiación cuando los individuos implicados son varones. En casos de agresiones sexuales en las que el semen del sospechoso varón se encuentra mezclado con células de una víctima mujer (Prieto, 2004).

Los polimorfismos del cromosoma Y permiten una detección más sensible de la presencia de ADN de un individuo masculino aun cuando éste se encuentre inmerso en una gran cantidad de ADN femenino. Con marcadores autosómicos esto no ocurre pues se produce la PCR preferentemente sobre el material femenino si la cantidad de células epiteliales femeninas es muy superior al número de espermatozoides.

Además, el uso de polimorfismos de ADN del cromosoma Y nos permite incluir o excluir a un sospechoso. Si bien la aplicación de estas nuevas metodologías es relativamente sencilla para examinar muestras biológicas frescas. Actualmente las nuevas metodologías, dan posibilidad de analizar un gran número de ellas a partir de material biológico degradado en un tiempo transcurrido (Prieto, 2004).

2. Muestras óseas

A pesar de que estos STR se utilizan en el estudio Forense de cualquier tipo de muestra biológica como sangre, semen, pelo, tejido, saliva, etc., en donde en la mayoría de las veces no representan un problema en la obtención del perfil genético, sin embargo, al tratarse de huesos humanos y dientes la obtención de ADN se complica (Edson *et al.*, 2004).

Según estadísticas del FBI del año 2004 con respecto al rendimiento que han mostrado diferentes muestras del esqueleto humano en el análisis genético, los huesos craneales presentan un rendimiento del 50 %, la mandíbula y la escápula del 70%, mientras que el húmero y fémur presentan rendimientos del 80% y 90%, por lo que se considera que estos últimos son más aptos para el análisis forense (Edson *et al.*, 2004).

Debido a que el ADN es bastante más estable en el hueso compacto y por ello es preferible recurrir a este tipo de muestras, debido a que se degrada rápidamente el ADN en tejidos blandos de cuerpos en descomposición como consecuencia inmediata del crecimiento bacteriano y la influencia de factores medioambientales como la temperatura, humedad, pH, estaciones del año y propiedades del suelo (Prieto, 2004), para entender acerca de este procedimiento ahondaremos en la composición del hueso.

2.1 Fisiología del sistema óseo.

Estructuralmente, el esqueleto consiste en unos 206 huesos formados por tejido óseo, cartílagos, médula ósea y el periostio o membrana que rodea los huesos. Estos se clasifican según su forma en largos, cortos, planos e irregulares. Pero también según el tipo de tejido que los componen que son: tejido compacto y tejido esponjoso o trabeculado (Tortora & Grabowski, 2000).

El tejido óseo forma la mayor parte del esqueleto, es el almacén que soporta nuestro cuerpo, protege nuestros órganos, realiza la producción de células sanguíneas, cumple con una homeostasis mineral, así como el almacenamiento de grasas y permite nuestros movimientos además de que se encuentra, continuamente en fase de remodelización. (Tortora & Grabowski, 2000)

2.2 Aspecto macroscópico de un hueso largo.

La estructura de un hueso largo, como el húmero, fémur, tibia, entre otros y los segmentos que lo componen son:

- **Diáfisis:** es la parte alargada y media del hueso
- **Epífisis:** extremos o terminaciones del hueso
- **Metáfisis:** unión de la diáfisis con las epífisis. En el hueso adulto esta parte es ósea, siendo cartilaginosa en la fase del desarrollo del mismo.

- **Cartílago articular:** es una fina capa de cartílago hialino que recubre la epífisis donde el hueso se articula con otro hueso. El cartílago reduce la fricción y absorbe choques y vibraciones.
- **Periostio:** membrana que rodea la superficie del hueso no cubierta por cartílago. El periostio es esencial en el crecimiento óseo, en su reparación y en su nutrición. También constituye el punto de inserción de ligamentos y tendones. Está compuesta por dos capas:
 - ❖ **La capa exterior** fibrosa formada por un tejido conjuntivo denso e irregular que contiene los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios que pasan al hueso.
 - ❖ La **capa osteogénica** contiene células óseas de varios tipos, fibras elásticas y vasos sanguíneos.
- **Cavidad medular:** es un espacio cilíndrico situado en la parte central en la diáfisis que en los adultos contiene la médula ósea amarilla (Figura 6) (Tortora & Grabowski, 2000).

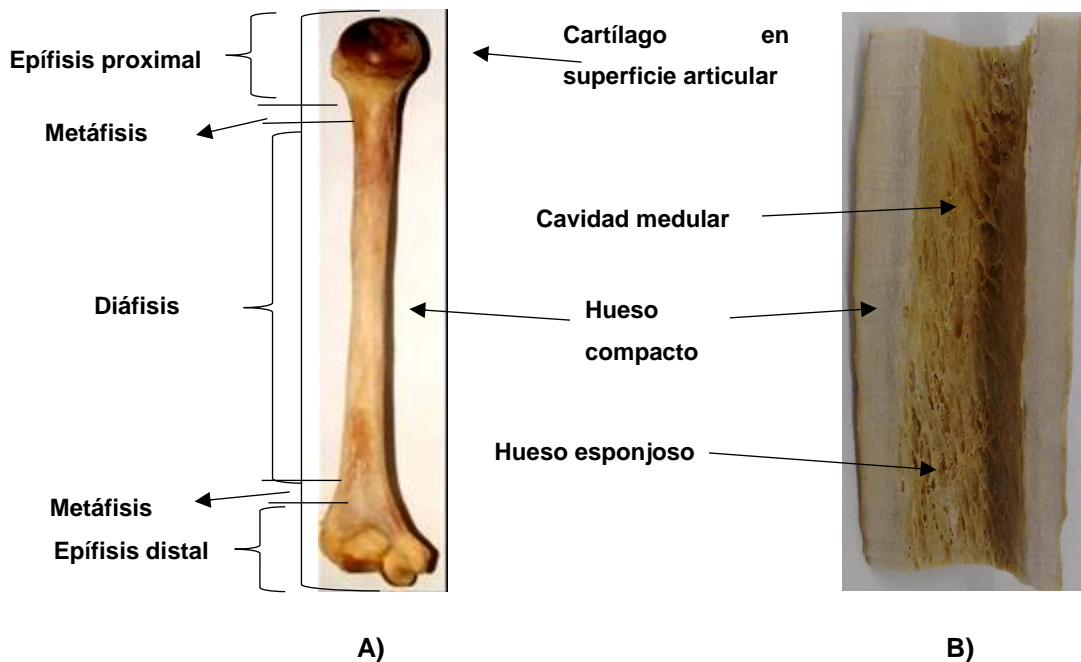


Figura 6.- Estructura general de un hueso largo. En el inciso A) se muestra cada una de las partes que conforman a un hueso largo como son sus epífisis proximales, distal, metáfisis, diáfisis, cartílago articular y en el inciso B) se presenta la cavidad medular, así como tejido compacto y esponjoso.

2.3 Histología.

Como otros tejidos conjuntivos, el hueso o tejido óseo está formado por células óseas vivas rodeadas por una matriz inerte y dura. La matriz está constituida por 25% de agua, 30% de materia orgánica (proteína y colágeno) y 45% de sales minerales como fosfato y carbonato de calcio. Las células por las cuales está constituido el hueso son de cuatro tipos: osteógenas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, la primera ayuda a la generación de las demás células, la segunda para la construcción del hueso, la tercera ayuda a mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho, y la última cumple con la función de destrucción de la matriz ósea (Tortora & Grabowski, 2000).

2.4 Composición del hueso.

Los componentes iónicos importantes de la matriz ósea son: El calcio, que es el principal componente del hueso, sin embargo es un mineral que no solo es necesario para darle fortaleza y dureza al hueso, sino que también es primordial para proteger otros procesos como el producir nuevas células sanguíneas, además de que existen otros componentes de la matriz ósea que actúan junto con el calcio como es el fosfato, magnesio, hidróxido de magnesio, fluoruros, citrato, cloruros y sulfato magnésicos encontrándose en menores cantidades, el componente cristalino más importante del hueso es la hidroxiapatita (fosfato tricálcico) y carbonato cálcico, siendo estas una de las sales minerales más abundantes. Estas sales minerales se depositan por cristalización en el entramado formado por las fibras de colágeno, siendo este componente que le proporciona la flexibilidad, durante el proceso de calcificación o mineralización (González, Sánchez, & Martínez, 2005).

2.5 Tejidos del hueso.

El hueso no es totalmente sólido, sino que tiene pequeños espacios entre sus componentes, formando pequeños canales por donde circulan los vasos sanguíneos encargados del intercambio de nutrientes. En función del tamaño de estos espacios, el hueso se clasifica en:

- **Compacto.** - Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales. El conjunto de un canal central recibe el nombre de osteon o sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteones se llaman láminas intersticiales, este tejido constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos, así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo, asimismo de que en este tejido se encuentran los osteocitos (Figura 6) (González, Sánchez, & Martínez, 2005).
- **Esponjoso.** - no contiene el sistema de Havers, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que

están llenos de la médula ósea roja. Además de que es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de estos (Figura 6, inciso B).

3. Métodos de extracción

En el contexto de la Genética Forense, la extracción del ADN a partir de restos óseos y muestras forenses de tipo biológico se enfrenta con una serie de dificultades técnicas, relacionadas la mayor parte de las veces con el estado de preservación del ADN (González, Sánchez, & Martínez, 2005).

Debido a esto los laboratorios forenses se enfrentan cada vez más, con muestras problemáticas provenientes del lugar de investigación del delito, que con frecuencia implican especímenes difíciles ya que muchas veces contienen solo pequeñas cantidades de ADN, y/o pueden contener inhibidores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además de ser muestras que regularmente son muy variables en calidad y que pueden existir compuestos traza de inhibición provenientes del lugar donde se encontró el indicio, pueden co-extraerse e influir en el proceso de tipificación (González, Sánchez, & Martínez, 2005).

Por lo que es necesario conocer diferentes protocolos de purificación que permitan satisfacer las particularidades de las muestras, así como las ventajas y desventajas que tienen las técnicas con la finalidad de conocer su eficiencia y sensibilidad, parámetros críticos que definen la idoneidad de un método de extracción para las muestras forenses.

El propósito del método de extracción de ADN en Genética Forense, es aislar la molécula del ADN del resto de material o sustancias químicas; por lo que se debe elegir un método eficiente de extracción que produce ADN purificado y de alta calidad para evitar en lo posible la inhibición de las etapas posteriores para obtener un perfil genético (González, Sánchez, & Martínez, 2005).

El ADN se debe separar de cualquier otro compuesto proveniente de las células o del ambiente del cual se tomaron las muestras. Se han realizado análisis forenses con una concentración mínima de 1 nanogramo por microlitro de ADN y se han obtenido buenos resultados, pero es importante saber que las muestras para los casos forenses son limitadas. Por lo tanto, todo procedimiento debe ser optimizado al máximo para alcanzar resultados más claros con escasas cantidades de material genético, ADN (González, Sánchez, & Martínez, 2005).

En la práctica, las muestras que se obtienen presentan cantidades considerablemente menores de ADN. Esto se debe a varios factores que afectan la disponibilidad del material genético:

- Cantidad: a pesar de la sensibilidad de la técnica utilizada cuando hay muy poca muestra hay muy poco ADN.
- Degradación del ADN: el ADN se puede degradar con facilidad por la exposición prolongada a condiciones ambientales adversas (oxidación, hidrólisis, exposición a rayos UV) o por contaminación bacteriana o micótica.
- Pureza de la muestra: la presencia de suciedad, grasa, colorantes, tierra, impurezas y otros contaminantes inhiben la amplificación del ADN de la muestra durante la PCR.

3.1 Métodos de extracción en hueso.

Hay factores que influyen en la preservación del ADN a partir restos óseos como es la temperatura, la humedad con un pH neutro o alcalino, los compuestos del suelo (ácido húmico y porfirinas), que pueden causar degradación del mismo, o la posible contaminación durante la recolección de la muestra (Barrio, 2013).

En la actualidad se han desarrollado muchos métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de restos óseos, así como del uso posterior del ADN purificado. Cada estrategia de extracción tiene sus ventajas y desventajas como se muestra en la Tabla 1 (Barrio, 2013).

La elección del método de extracción será crucial, y a menudo supone un compromiso entre cantidad y calidad del ADN extraído. En la actualidad se hallan varios protocolos para la extracción de ADN a partir de tejido óseo, entre los cuales se distinguen el método de sílice, la extracción orgánica, Kits comerciales, el procedimiento de Chelex, un método prometedor basado en el lavado del ADN con columnas de hidroxiapatita por incubación en altas concentraciones de fosfato de sodio, el método estándar con descalcificación y sin descalcificación previa del tejido óseo así como la técnica de desmineralización, la cual es resultado de la innovación en la descalcificación. (Barrio, 2013)

Tabla 1. *Diferentes métodos de Extracción de ADN a partir de restos óseos.*

Protocolo «Fenol-cloroformo»	Protocolo «Silica-sal» (GuSCN)	Protocolo «Desmineralización-silica» (ICMP)	Protocolo «Fishing» (Purificación)
Ventajas			
Mayor cantidad de ADN (rendimiento). Pureza (eliminación de compuestos orgánicos). Procedimiento habitual en la mayoría de los laboratorios (simplifica su uso).	Mayor posibilidad de obtener un perfil genético. Eliminación eficiente de inhibidores de la PCR. Posibilidad de automatización	Mayor posibilidad de obtener un perfil genético. Eliminación eficiente de inhibidores de la PCR. Permite procesado a gran escala.	Eliminación eficiente de inhibidores de la PCR. Protocolo rápido (todo el procesamiento se puede realizar en un día) y sencillo. Procesado de elevado número de muestras (hasta 16 muestras en una única tanda) Automatización
Inconvenientes			
No eliminación completa de inhibidores de la PCR. Uso de disolventes orgánicos (muy tóxicos). Procedimiento largo	Procedimiento largo. Procedimiento complejo (aunque se han conseguido estrategias de simplificación)	Posibilidad de contaminación cruzada. Aún no ha sido validado para su automatización.	Menor cantidad de ADN recuperado. Elevado coste, fundamentalmente por el uso de sistemas automatizados.

Nota. Resumen con las ventajas e inconvenientes de cada uno de los protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de restos humanos esqueléticos (Barrio, 2013).

Antecedentes

Uno de los principales problemas para la extracción de ADN en restos óseos es debido a la degradación del ADN por factores ambientales y la presencia de inhibidores derivados del suelo como los ácidos húmicos, es por ello que los huesos y los dientes protegen claramente el ADN de la degradación ambiental y el ataque biológico a través de su solidez física y química.

De acuerdo con Latham & Miller, 2019 en la recuperación y análisis de ADN a partir de restos óseos en los contextos forenses modernos, la generación de un perfil de ADN a partir de huesos y dientes es una parte importante del proceso de identificación tanto en casos de desastres masivos como de restos no identificados.

Debido a que las muestras esqueléticas son a menudo los únicos materiales biológicos que quedan después de la exposición a condiciones ambientales, calor intenso, ciertos eventos traumáticos y en los casos en que ha pasado una cantidad significativa de tiempo desde la muerte del individuo, como el ADN analizable a menudo persiste en los huesos y los dientes mucho más tiempo que en los tejidos blandos del cuerpo, porque la estructura rígida de los huesos y los dientes proporciona cierta protección contra la degradación del ADN.

Las moléculas de ADN se unen químicamente a la hidroxiapatita de los tejidos duros, lo que estabiliza el ADN y proporciona cierta protección contra la degradación. Por lo tanto, el grado de degradación del ADN esquelético está, en parte, relacionado con la degradación ósea y dental. Dado que el muestreo de tejidos duros para el análisis genético es un proceso destructivo, es fundamental comprender los factores que son más prometedores para la conservación del ADN, la degradación del material biológico se produce como resultado de una serie de reacciones químicas, y la autólisis muestra una actividad química máxima entre 34 °C y 40 °C.

Todas las reacciones químicas están fuertemente influenciadas por la temperatura, con un aumento de dos a tres veces en la velocidad de reacción por cada 10 °C de aumento en la temperatura, la presencia de humedad en el ambiente puede

afectar la descomposición biológica, las moléculas de agua participan en reacciones hidrolíticas que actúan para fragmentar y modificar las moléculas de ADN, las moléculas de oxígeno participan en reacciones oxidativas que modifican las bases del ADN y crean lesiones en las cadenas de ADN. Este proceso conduce a una mayor degradación, así como a una distorsión helicoidal que puede complicar los análisis genéticos posteriores.

Además, los microorganismos que participan en la descomposición biológica producen enzimas que fragmentan las moléculas de ADN, los microbios no digieren el ADN directamente, sino que digieren el componente proteico del hueso, lo que hace que el ADN esquelético sea más propenso a sufrir daños. La composición química del suelo puede complicar los análisis genéticos posteriores realizados en las moléculas de ADN del esqueleto. Los huesos y los dientes alcanzan un equilibrio químico con el ambiente a través de la lixiviación de minerales y la absorción de diferentes solutos del suelo la descomposición biológica ocurre más rápidamente en ambientes ácidos y alcalinos (en lugar de neutrales). Las modificaciones químicas de la hidroxiapatita y el ADN están influenciadas por el pH del entorno de depósito.

La tasa de descomposición microbiana también está influenciada por el pH del entorno de depósito, los huesos más grandes tienden a sobrevivir mejor y, por lo tanto, están disponibles de manera diferencial para el muestreo para el análisis genético. Las porciones corticales densas de los huesos de las extremidades inferiores y los tejidos más duros de los dientes tienden a ser consistentemente confiables en la generación de perfiles de ADN en comparación con el hueso esponjoso menos denso, la descontaminación se puede lograr eliminando físicamente la superficie externa del hueso, sumergiendo el hueso o el diente en una solución de lejía o exponiéndolo a la radiación ultravioleta, después de la descontaminación de la superficie, los tejidos duros a menudo se pulverizan y posteriormente se incuban en tampón de extracción y proteinasa K, que juntos disuelven las porciones orgánica e inorgánica del tejido óseo. La cantidad de polvo de hueso que se utiliza en este paso varía mucho de un laboratorio a otro, y la mayoría de los protocolos publicados exigen entre 2,5 g y 0,2 g de material de partida.

El objetivo de las técnicas de extracción de ADN esquelético es maximizar el rendimiento de ADN, minimizar cualquier daño adicional en el ADN y eliminar cualquier inhibidor que pueda co-purificarse con el ADN esquelético e interferir con análisis genéticos posteriores, es decir, la capacidad de purificar grandes cantidades de ADN informativo de los tejidos duros sería beneficiosa en numerosos contextos forenses y arqueológicos.

Como plantea Vullo *et al.*, 2019 con el tema de los criterios de muestreo óseo para el genotipado de ADN en la categorización de muestras macroscópicas y resultados de tipificación de STR, el Equipo Argentino de Antropología Forense (EAAF) investiga los restos óseos que pueden haber estado expuestos a diferentes condiciones como humedad, microorganismos, temperatura y pH, diferentes tipos de suelo que pueden producir diversos grados de conservación. El objetivo de su estudio fue evaluar el aspecto macroscópico de diferentes tipos de restos óseos y compararlo con los resultados de la tipificación STR. La eficiencia de la clasificación macroscópica se determinó sobre la base de la concentración de ADN de la muestra ósea obtenida mediante el ensayo de PCR en tiempo real y los 15 loci de cualquiera de los kits de amplificación de STR utilizados en su análisis.

Se analizaron un total de 1727 restos óseos, incluidos dientes y 19 tipos diferentes de piezas óseas. las muestras se clasificaron en cuatro categorías según el aspecto macroscópico visual.

- Grupo 1.- Corresponde a muestras con muy buena apariencia, los huesos de esta categoría tienen pocas manchas y/o pigmentaciones que se eliminaron fácilmente o incluso pueden no estar presentes, además de tener una fuerte firmeza.
- Grupo 2.- Involucra muestras con un buen estado de conservación, su estructura permanece intacta, pueden presentar alteraciones superficiales que se eliminan totalmente durante la limpieza.
- Grupo 3.- Su apariencia visual es regular, debido a que los huesos muestran alteraciones marcadas en su superficie y su estructura está comprometida debido a que tiene un aspecto arenoso que contribuye al desprendimiento de abundantes

partículas de polvo durante la limpieza y por tanto se pierde gran cantidad de material.

- Grupo 4.- Las muestras se encuentran en mal estado de conservación, los huesos tienen un aspecto frágil-arenoso por la alteración de su estructura con numerosas manchas y fracturas, este tipo de muestras son extremadamente frágiles y tienden a romperse durante la limpieza o al menor contacto con cualquier otro material.

Además, no se incluyeron muestras totalmente quemadas porque la reproducibilidad de los resultados genéticos es extremadamente difícil. Todas las muestras se limpiaron mecánicamente, se lavaron, se expusieron a hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 min y se lavaron nuevamente; finalmente se enjuagó brevemente con etanol al 96 % y se irradió con luz ultravioleta (254 nm) durante 15 min por lado. Las muestras se pulverizaron utilizando 6770 Freezer Mill (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ, EE. UU.). Se utilizaron dos métodos de extracción diferentes que fueron:

- Qiagen Blood Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), Para este método, las muestras fueron previamente desmineralizadas con EDTA 0,5 M pH 8 a temperatura ambiente durante 72 h con movimientos de rotación.
- PrepFiler BTA Forensic Extraction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en la plataforma Automate Express. Para este método, el polvo óseo se trató con tampón de lisis (EDTA 0,5 M y N-laurilsarcosinato al 1 %), proteinasa K 20 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y DTT 1,0 M (Sigma-Aldrich) y se incubó durante la noche. a 56 °C por completo desmineralización.

El ADN genómico humano se determinó utilizando el kit de cuantificación de ADN humano Quantifiler™ o el kit de cuantificación de ADN Human Plus Quantifiler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems). La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando el kit de amplificación por PCR AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus, el kit de amplificación por PCR GlobalFiler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y el sistema PowerPlex® Fusion (Promega, Madison, WI, EE. UU.). En el presente estudio solo se consideraron los

marcadores STR compartidos por estos kits. Los productos amplificados se separaron y detectaron en ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer o 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

La cuantificación mediante PCR en tiempo real reveló que las muestras con un aspecto visual muy bueno y bueno (son los grupos 1 y 2) debido a que tienen valores de concentración de ADN más altos que aquellas con un aspecto regular o malo (grupo 3 y 4), independientemente del método de extracción utilizado. La baja concentración de ADN obtenida para muestras regulares y de mala apariencia puede explicarse por el hecho de que su estructura no se conserva y, por lo tanto, el ADN está totalmente expuesto a condiciones ambientales severas. En cambio, los restos óseos con muy buen y buen aspecto macroscópico presentaron una concentración de ADN considerablemente mayor ya que su estructura aún mantiene todas las características que protegen al ADN de agentes externos. Sus resultados muestran una correlación significativa entre los grupos descritos anteriormente debido a su función del aspecto macroscópico de las muestras óseas con recuperación de ADN y el número de STR. Estos datos pueden ser una guía útil para la selección de muestras de restos óseos con mayores posibilidades de obtener buenos resultados en función de su aspecto macroscópico.

Al igual que Catelli *et al.*, 2019 menciona en su estudio de análisis de STR de restos óseos exhumados de un “pozo de agua” seco utilizado como entierro clandestino masivo en Argentina, el cual contenía restos mezclados, así como partes del cuerpo parcialmente articuladas. A partir del 2011 el Laboratorio de Genética Forense del Equipo Argentino de Antropología Forense (LGF-EAAF) procesa muestras post mortem (PM) exhumadas del pozo para lograr la re-asociación intra-esquelética y la identificación de los cuerpos o partes del cuerpo.

La muestra de hueso para estudios genéticos consistió principalmente en diáfisis de huesos largos y dientes extraídos de cráneos, aunque también se exhumaron del fondo del pozo otros restos óseos como vértebras, costillas y clavículas. Luego de la re-

asociación de los elementos esqueléticos exhumados del pozo, es necesario continuar trabajando en la identificación de estos restos, por lo tanto, los perfiles únicos de STR obtenidos se comparan con la base de datos de referencia familiar ante mortem (AM).

Se analizaron 981 restos óseos que han sido enterrados en pozo de agua seca con 30 años de intervalo post mortem. El 65% de ellos eran huesos largos y dientes compactos, mientras que el 35% restante eran huesos esponjosos o menos compactos. Los protocolos de extracción de ADN han cambiado donde anteriormente se usaban 2 g de hueso procesado manualmente usando el método de extracción de ADN basado en sílice con maxicolumnas de QIAGEN a una plataforma automatizada de extracción de ADN basada en sílice, usando el sistema de extracción de ADN Automate Express y PrepFiler™ BTA Forensic Kit de extracción de ADN (Applied Biosystems), que procesa 1 g de hueso con desmineralización.

Utilizaron Quantifiler Human y Quantifiler HP para la cuantificación de ADN, los kits comerciales utilizados para la tipificación de STR fueron Identifiler y Power Plex Fusion. el software que se utilizó para los cálculos estadísticos fue DNView (herramientas de análisis de parentesco y tinción sin mezclar).

De las 981 muestras analizadas, los resultados de la tipificación de los marcadores STR autosómicos permitieron investigar la re-asociación intra-esquelética en 871 muestras óseas (89 %). Los huesos largos de la parte inferior del cuerpo, los dientes y algunos huesos del cráneo como mastoides y peñascos fueron los elementos esqueléticos que mejores resultados arrojaron, se observó una menor tasa de éxito en la tipificación de STR en las extremidades de la parte superior del cuerpo.

Se tipificaron con éxito para marcadores STR autosómicos y se re-asociaron en 147 perfiles STR únicos, lo que significa que al menos 147 individuos diferentes fueron arrojados al pozo de agua. Después de la re-asociación, los perfiles STR únicos obtenidos de los restos óseos se compararon con la base de datos de referencia familiar ante mortem (AM) para identificar a las víctimas (comparaciones genéticas AM-PM), siendo posible restaurar 113 víctimas a sus familias. Otro desafío de ese proyecto de identificación fue la presencia de víctimas biológicamente relacionadas dentro del pozo.

Además, el uso de ADN de baja calidad es un desafío común para el análisis STR, la necrosis tisular, por ejemplo, da como resultado la degradación y el acortamiento del ADN, la necrosis generalmente ocurre más fácilmente en tejidos blandos que en tejidos duros. Es por ello para el análisis STR, el tejido duro más utilizado es el hueso, que conserva el ADN de forma más eficaz que el tejido blando. Como Samsuwan *et al.*, 2018 que propone un método para extraer ADN de tejidos duros para su uso en identificación forense. Ya que el esmalte es el tejido más duro del cuerpo humano, plantearon la hipótesis de que los dientes pueden conservar el ADN mejor que el hueso. En su estudio, los experimentos que utilizaron fueron dientes y huesos porcinos como imitadores de dientes y huesos humanos que se expusieron a una variedad de entornos que imitaban las condiciones de escenas de crímenes conocidos por varios períodos de tiempo, el más largo de 1 año.

Los dientes y huesos fueron expuestos a 11 condiciones diferentes que fueron: dejados al aire libre, enterrados en el suelo, en arena, sumergidos en agua, en agua de mar, empapados en sosa cáustica, en ácido sulfúrico, quemados con caucho, almacenados a 4, -20 y 80 ° C por 5 periodos de tiempos diferentes para imitar una serie de escenas de delitos comunes. El ADN se extrajo con método estándar usando fenol-cloroformo, la calidad del ADN se midió por la presencia o ausencia de productos de PCR, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó como el primer paso del análisis STR y la calidad del ADN se evaluó utilizando cebadores para la β -actina porcina (*ACTB*) y el ADN mitocondrial (ADNmt). También, se probaron inhibidores de la PCR en determinadas condiciones seleccionadas.

Los resultados demostraron que la calidad del ADN extraído de los dientes era mayor que el extraído del hueso en los siguientes ambientes: Enterrado en arena, empapado en sosa cáustica y quemado con caucho. Por el contrario, la calidad del ADN extraído del hueso fue mayor que la extraída de los dientes cuando las muestras fueron enterradas en el suelo o sumergidas en agua. No hubo una gran diferencia en la calidad del ADN extraído de huesos y dientes en varios entornos, incluido el estar sumergido en agua de mar, empapada en ácido sulfúrico, dejada al aire libre y almacenada a 4, -20 y -80°C. Así pues, los resultados sugirieron que la PCR en el uso de cebadores de ADNmt

tuvo un mejor rendimiento que el de ACTB . Finalmente, se indicó que los componentes del agua de mar puede inhibir la amplificación por PCR.

Por otra parte, el hueso, a diferencia del resto de los tejidos conjuntivos, posee componentes extracelulares calcificados que lo hacen un material duro, capaz de resistir en el tiempo más que el resto de los tejidos (excluyendo a los cabellos). A pesar de parecer solamente un material de soporte, el hueso es un material vivo y dinámico. Sin embargo, la degradación de los huesos es evidente e irreversible en muchas de las muestras, lo que dificulta la extracción de ADN en cuanto a su cantidad y calidad. El poder obtener la mayor cantidad de información posible de estas muestras es muy importante a nivel legal. Como lo hace notar Siriboonpiputtana *et al.*, 2018 en su análisis Genético Forense de muestras de restos óseos, el presente estudio trató de encontrar el método que proporcionó las mejores condiciones de extracción de ADN a partir de restos óseos.

El protocolo se basó en la de tipificación de ADN para investigar muchos restos esqueléticos en diferentes grados de descomposición que se establecieron para el sistema de clasificación con el objetivo de determinar previamente la asociación entre los niveles de descomposición y la eficacia general de la amplificación de STR.

Se trabajo con un total de 80 muestras de hueso que se sometieron al aislamiento de ADN utilizando el sistema DNA IQ™ modificado (Promega, EE. UU.) Para la extracción de hueso seguido de un análisis STR mediante AmpFLSTR Identifier® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). En el grupo de baja destrucción, los perfiles de STR completos se observaron como 84,4%, mientras que los perfiles parciales y no amplificados se encontraron como 9,4% y 6,2%, respectivamente. Además, en el grupo de destrucción media, se observaron perfiles STR tanto completos como parciales como 31,2%, mientras que el 37,5% de este grupo no pudo amplificar.

Sin embargo, no se obtuvo la purificación del ADN y no generar el perfil STR en ninguna muestra de las muestras de hueso altamente destruidas, los huesos

compactos como Fémur y Húmero tienen una alta tasa de amplificación exitosa superior a los huesos sueltos / esponjosos.

De la misma forma la exposición de los huesos al calor en presencia de humedad rompe los enlaces fosfodiéster, dejando el ADN fragmentado en las células óseas. Esto también limita la posibilidad de generar un perfil completo de la víctima. Uzair, Rasool, & Wasim, 2017 señalan en su evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN a partir de huesos humanos quemados y la generación de perfiles genéticos para su identificación, se tomaron 10 muestras de huesos de cuerpos humanos quemados que fueron recuperados de diferentes escenas de incendios, de los cuales el ADN de esos tejidos humanos quemados se aislaron mediante cuatro métodos de extracción diferentes: el método de extracción orgánica, el método de desmineralización total, el método del Kit Qiagen y el método de extracción Chelex.

Los perfiles STR de las víctimas se generaron en un analizador genético utilizando un Kit AmpFISTR Identifier® Plus y se analizaron en Gene Mapper ID-X, el ADN aislado de los huesos con los métodos de extracción por desmineralización total y el método de extracción orgánica fueron de más alta calidad debido a la eliminación eficiente de inhibidores, el ADN obtenido mediante estos dos métodos generó con éxito los perfiles STR de las víctimas, no obstante la calidad del ADN aislado obtenido a través del kit de Qiagen fue comparativamente baja, en comparación de los perfiles STR de las víctimas que se generaron con éxito. En cuanto al Kit Chelex no se pudo extraer ADN de buena calidad en gran cantidad de los huesos quemados, encontrando inhibición en todas las muestras en diversos grados.

No obstante la obtención de ADN a partir de tejido calcificado es un proceso dispendioso que puede resultar poco efectivo por cuenta del deterioro de las moléculas y los efectos adversos del entorno ambiental; la extracción de la molécula a partir de este tipo de tejido precisa una desmineralización previa con agentes quelantes de iones divalentes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sierra *et al.*, 2017 refiere en

su protocolo unificado de digestión y descalcificación para tres métodos de extracción de ADN en restos humanos.

Utilizaron los métodos de extracción de ADN de tejido mineralizado: partículas orgánicas (fenol-cloroformo), sílice (QIAquick, QIAgen) y magnéticas (Prepfiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit); cada con su propio procedimiento para la descalcificación, digestión, purificación y elución del ADN, así como para la obtención de la cantidad inicial de material.

Los tres métodos son eficientes, estandarizaron un protocolo de descalcificación-digestión para usarlo con cualquiera de los tres métodos de purificación de ADN. Donde evaluaron la cantidad de concentración de polvo, detergente y proteasa, dispositivos concentradores y un tampón para la desmineralización en huesos y dientes de casos forenses del Laboratorio y ADN de líneas celulares comunes mediante la evaluación de la cantidad de ADN recuperado y la calidad del perfil genético.

El protocolo unificado de digestión y descalcificación permitió una degradación completa del polvo de hueso y una recuperación de ADN de buena calidad, independientemente del método de purificación utilizado en el paso posterior. El porcentaje de éxito con ese protocolo fue casi del 80%.

A su vez Desmyter *et al.*, 2017 en su trabajo de extracción orgánica de lisados óseos compara la purificación del ADN con perlas de sílice, donde los lisados óseos resultantes de la descalcificación y el tratamiento con proteinasa K se purificaron con el kit DNA IQ™ Casework Pro para la automatización Maxwell®16 (Promega, WI). A pesar de su éxito en la mayoría de los casos, la purificación del ADN con perlas de sílice paramagnéticas fracasó en algunas muestras difíciles.

Este fallo en la recuperación del ADN a menudo se asoció con la obstrucción del filtro durante la reducción de volumen requerida del lisado para permitir la carga en el automática. Se probaron dos modificaciones del método estándar para una filtración y purificación más eficientes. La adición de colagenasa al lisado redujo el tiempo de espera del filtro pero no mejoró el rendimiento de ADN.

Mientras que la extracción orgánica del lisado crudo resolvió la obstrucción del filtro y dio como resultado una purificación exitosa del ADN. El método modificado en el que se cargó un lisado tratado con fenol en el autómata dio como resultado un perfil STR exitoso de los restos esqueléticos de los 13 cuerpos no identificados probados, que mostró una amplia variedad en el intervalo post mortem y las condiciones de conservación.

La variación en el rendimiento de ADN entre las 28 muestras analizadas mostró la importancia de la selección del tipo de hueso y el muestreo múltiple en la elaboración de perfiles STR satisfactoria de restos esqueléticos. A pesar de las desventajas inherentes al fenol, la extracción orgánica de lisados óseos brutos mejoró la eficiencia de la purificación del ADN con perlas de sílice paramagnéticas. El método combinado de extracción orgánica y purificación con perlas de sílice dio como resultado el perfil STR de muestras de hueso desafiantes.

Desde otro punto de vista tradicionalmente, se ha utilizado la extracción orgánica con fenol-cloroformo como principal método de purificación; no obstante dado el alto grado de toxicidad de los reactivos y el tiempo que se toma el procedimiento, se han desarrollado métodos alternativos, como la extracción con sílice o con perlas magnéticas recubiertas de polímero, los cuales permite trabajar con volúmenes pequeños y menor cantidad inicial de tejido calcificado. Rothe & Nagy 2016 en su estudio de comparación de dos métodos de extracción basados en sílice para el aislamiento de ADN de huesos, ya que el ADN de este tipo de muestras es más exigente debido a su robustez y al contenido bajo de ADN, el gran desafío se debe a la naturaleza múltiple del material pues se define por varios factores: edad, almacenamiento, condiciones ambientales y la contaminación con inhibidores.

Sin embargo, el laboratorio trabajo con dos métodos de extracción diferentes, basados en membranas de sílice o el uso de perlas de sílice, compararon el éxito de amplificación de los dos métodos a partir de muestras de hueso con diferentes calidades y con presencia de inhibidores, del cual comprobaron que la extracción de ADN mediante

el método de membrana de sílice tiene un mayor rendimiento de ADN, pero con un mayor riesgo de co-extraer impurezas que puedan actuar como inhibidores.

Por el contrario con el método de perlas de sílice muestra una menor co-extracción de inhibidores pero con un menor rendimiento de ADN. Por tanto la tarea más ambiciosa es determinar la calidad del material óseo, ya que hay que considerar que cada material óseo debe revisarse de forma independiente con respecto al método de análisis y extracción.

Justificación

Previos estudios han demostrado que el ADN puede persistir en restos humanos antiguos, como son en muestras óseas (huesos o dientes) debido a que son capaces de soportar condiciones ambientales drásticas comparadas con otro tipo de muestras por ejemplo los tejidos blandos.

Así pues, en la década de los años 80, fueron importantes, los avances en las técnicas de extracción de ADN a partir de distintos tejidos como restos óseos, tejidos momificados, etc., así como el descubrimiento de los marcadores genéticos analizados y su progresiva aplicación de forma cada vez más optimizada.

Dado que las muestras óseas son consideradas críticas en Genética Forense, debido a las variables intrínsecas y extrínsecas como; tipo de hueso, antigüedad y condiciones ambientales en que se encuentran las mismas. Es de suma importancia contar con metodologías que permitan obtener ADN en cantidad y calidad para la obtención de un perfil genético.

Por estas razones esta investigación se enfocó en el método para la extracción y purificación de ADN en restos óseos humanos, para el estudio de los polimorfismos, mediante el kit de amplificación *Identifiler* (16 STR) principalmente en la obtención de ADN en la cantidad y calidad suficiente.

Hipótesis

Hipótesis nula:

En la utilización del método de extracción y purificación de ADN en restos óseos humanos, el laboratorio de Genética Forense no detecta atributos y limitaciones para la obtención de un perfil genético.

Hipótesis alterna:

En la utilización del método de extracción y purificación de ADN en restos óseos humanos, el laboratorio de Genética Forense detecta atributos y limitaciones para la obtención de un perfil genético.

Objetivos

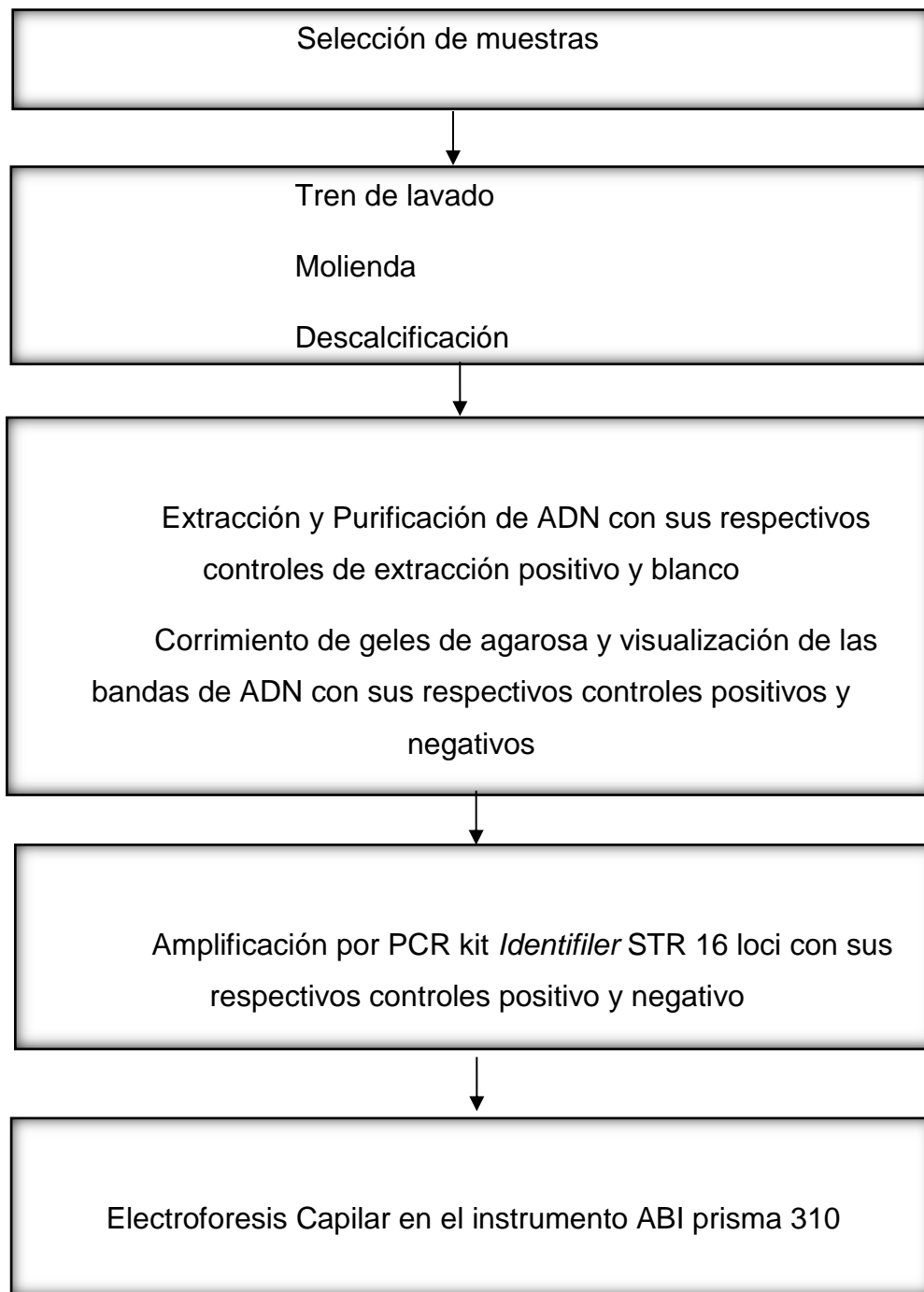
7.1 Objetivo General.

Evaluar la eficiencia del método de extracción orgánica y purificación de ADN en restos óseos humanos, para el estudio de los polimorfismos, mediante el kit de amplificación *Identifiler* (16 STR).

7.2 Objetivos Particulares.

- ❖ Desarrollar el método de extracción con la técnica orgánica fenol-cloroformo ADN a partir de restos óseos humanos.
- ❖ Desarrollar el método de purificación de los extractos genómicos de ADN a partir de restos óseos humanos con Microcon-100 (Millipore, Billerica, MA, USA).
- ❖ Clasificar las muestras óseas que van a ser analizadas en tipo de hueso, lugar de procedencia, tamaño, morfología y edad.
- ❖ Comparar la obtención de perfiles genéticos completos, según la prioridad de selección de huesos.

Esquema de trabajo



Material y Método

9.1 Selección de muestras.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General de Justicia del Estado de Puebla se seleccionaron restos óseos humanos, almacenados en el Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General de Justicia del Estado de Puebla de años anteriores del 2005 al 2008.

Se seleccionaron solo restos de huesos largos con los que contaba el almacén temporal de indicios del Laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General de Justicia del Estado de Puebla, tomando como prioridad, fémur, húmero y tibia. Porque brindan suficiente material para el análisis, especialmente en la identificación, este tipo de huesos presentan un cilindro de pared gruesa con consistencia compacta, una cavidad central voluminosa, ocupada por médula ósea con función de envolver los elementos formadores de la sangre misma.

También posee características como alta resistencia a la degradación. El hueso compacto carece de porosidades visibles a simple vista, de esta manera las estructuras más externas brindan protección a las células más internas (como las osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), las cuales son de interés en el análisis molecular porque contienen ADN.

En algunos casos al no contar con este tipo de huesos, se trabajaron con otro tipo de hueso como radio, cubito, costilla de las cuales estaban presentes.

9.2 Métodos.

9.2.1 Pre- Procesamiento del hueso.

Lavado.- Los huesos que presentaban aun restos de tejido se descarnaron completamente con la ayuda de un bisturí para dejarlos lo más limpio posible, el tejido que se llegó a recuperar se guardó en envases estériles o anaclines previamente

etiquetados siempre y cuando este tejido fuera viable para la extracción, se valoró además si presentaban médula y esta se rescató para procesarla como tejido, posteriormente los huesos se lavaron con agua corriente y se dejaron en un recipiente que contenía agua destilada, jabón en polvo y cloro al 5 % por un día, al siguiente día se enjuagaron con agua corriente y después con agua destilada para dejarlos un día en alcohol al 70 %, seguido de un lavado con agua corriente y agua destilada, por último se dejaron en agua destilada por 24 horas. Terminando el tren de lavado se colocaron en un horno seco (Precision) a 40°C hasta su completo secado.

Molienda. - Una vez que los huesos estuvieron secos se cortaron en fragmentos pequeños para realizar su pulverización mediante un molino de análisis (IKA modelo A 11 Basic) y así obtener un polvo fino.

Descalcificación.- Obtenido ya el polvo necesario se pesaron 2 g, que se colocaron en un tubo falcón de 15 ml agregando 7 ml de EDTA al 0.5 M pH 8, la mezcla se homogenizó con el vortex (Genie 2) durante 3 min con intervalos de reposo de 15 a 30 min (esto se repitió 2 veces), la muestra se centrifugó a 3000 rpm por 10 min (centrifuga Solbat C-6000), el sobrenadante se decantó agregando nuevamente EDTA, hasta realizar los cambios necesarios para la descalcificación, la cual fue monitoreada con oxalato de amonio hasta la desaparición de un precipitado blanco, posteriormente se realizó la extracción.

9.2.2 Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

La extracción se realizó con la técnica Orgánica Fenol- Cloroformo, a la muestra descalcificada se les adicionaron 3ml de amortiguador de lisis (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de EDTA pH 7.5, 50 mM NaCl y 2% SDS) y 100 µl de proteasa K (10 mg/ µl) mezclando completamente, la muestra se incubó a 56 °C, durante 3 horas, en un baño María en seco (isoTEMP 145D Fisher Scientific). Transcurrido ese tiempo se adiciono 1:1 volúmenes de la solución Fenol/Cloroformo/Isoamílico (25:24:1) agitando los tubos vigorosamente durante 10min en un vortex ò bien hasta la formación de una emulsión para después centrifugar a 3500 rpm por 30 min para separar las fases, la fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio, repitiendo este paso una vez más.

Para eliminar los residuos de Fenol/Cloroformo/Isoamílico se adiciono 1:1 volúmenes de Cloroformo/Isoamílico (24:1) homogenizando la muestra por 10min con posterior centrifugación a 3500 rpm por 30 min para la separación de las fases, transfiriendo la fase superior a tubos limpios, repitiendo este paso una vez más, se dispensaron 450 µl de la fase acuosa en tubos eppendorf de 1.5 ml.

Para la precipitación del ADN se adicionaron 50 µl de Acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 ml de alcohol absoluto invirtiendo varias veces el tubo para completa homogenización. Las muestras se dejaron a -20 °C toda la noche, al día siguiente el ADN se recuperó por centrifugación (Eppendorf 5417R refrigerada) a 14000 rpm por 10 min a 6 °C, se decantó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de etanol al 70 % en frío y se centrifugo a 10 000 rpm por 10 min 6 °C, posteriormente se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se dejó secar a 37 °C, para posteriormente resuspender el ADN en 20 µl de agua destilada estéril.

La muestra se concentró en Microcon-100 (Millipore, Billerica, MA, USA). La membrana de la columna se humedeció en 20 µl de agua estéril, se adiciono la muestra, centrifugando a 3500 rpm por 12 min a 4 °C. Para recuperar la muestra la columna se invirtió en un tubo limpio y se centrifugo a 2500 rpm por 12 min a 4 °C. En cada lote de muestras se incluyó un blanco de extracción el cual consiste solamente de los reactivos de extracción sin adición de muestra ósea y para el control positivo de extracción consiste en los reactivos de extracción adicionando una muestra ósea descalcificada de un perfil genético conocido.

9.2.3 Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez realizada la extracción y purificación de las muestras, se verificó la integridad del ADN, mediante geles de agarosa al 1 %. Se colocaron 9 µl del producto de extracción en cada pozo adicionando 1µl de amortiguador de carga (Azul de Bromofenol 10X), es importante que la muestra esté libre de etanol.

Los geles se corrieron en una cámara horizontal (Fisher Biotech 710) utilizando una fuente de poder (Termo EC EC270-90), y un buffer de corrimiento de TBE (0.5X),

con una corrida electroforética de 110 mV por 30 min, los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio durante 10 min transcurrido este tiempo se enjuago el gel en agua destilada para eliminar los excesos de Bromuro y después se observaron a través de un transiluminador (U.V High Performance). En cada lote de muestras se incluyó un blanco y positivo de extracciones con un perfil genético conocido.

9.2.4 Amplificación de los productos de extracción mediante PCR.

La amplificación de los fragmentos de interés se llevó a cabo con el kit comercial Identifiler PCR Amplification Kit, de la compañía de la marca Applied Biosystems® de Life Technologies™ Carlsbad, CA.USA.

Para la amplificación del ADN obtenido de la extracción de las muestras, se tomó en cuenta de manera cualitativa las bandas observadas en los geles de agarosa, asignando de 0 a 1, 3 o en algunos casos más cruces dependiendo de la visibilidad de la banda, es decir, si la banda de ADN era intensa o fácilmente observada se le asignaba de una a tres cruces o en caso de que no fuera visible se colocaba una lectura de 0. La cantidad de muestra que se tomó para la amplificación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. – *Parámetros cualitativos de la cantidad de muestra a amplificar*

Lectura del gel	Cantidad de muestra (μ l) a amplificar
-	1 ò 1.5
+	(1/2) 1
++	(1/5) 1
+++	(1/8) 1

Nota. La cantidad de muestra a amplificar fue de 1 μ l cuando se visualizaba una banda tenue de ADN ò 1.5 μ l de muestra cuando no se visualizaba una banda de ADN en el gel de agarosa. Se realizaron diluciones de las muestras (1/2,1/5 o 1/8) de acuerdo a las lecturas realizadas.

De la mezcla de PCR se tomaron las cantidades recomendadas por el fabricante y se colocó en un tubo para PCR rotulado con su clave correspondiente, posteriormente se agregó la cantidad de muestra según lo especificado en la tabla 2. Este procedimiento

se realizó en la campana de flujo laminar (LABCONCO) para evitar contaminación. Los tubos se colocaron en el termociclador Gene Amp PCR System modelo 9700 (Applied Biosystems® de Life Technologies™ Carlsbad, CA.USA) asegurando que estos estuvieran bien cerrados, con un termo ciclado de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En cada lote de muestras se agregó un control negativo de amplificación que consiste solamente de reactivos de amplificación sin la adición de ADN y un control positivo de amplificación, este control consiste en los reactivos de amplificación más la adición de una muestra de ADN con perfil genético conocido.

9.2.5 Electroforesis Capilar.

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems® de Life Technologies™ Carlsbad, CA.USA). En tubos debidamente rotulados se colocaron 20 µl de mezcla Formamida Liz y 2 µl de los productos de PCR, es importante mezclar bien la solución de Formamida Liz.

Para preparar la Ladder (escalera alélica) se colocaron 20 µl de mezcla Formamida Liz más 1 µl de Identifiler Ladder. Las muestras fueron desnaturalizadas en un termociclador a 94 °C por 3 minutos y sometidas a un choque térmico en hielo por 3 minutos para evitar la re-naturalización, este paso es necesario ya que la lectura que el aparato ABI PRISM 310 (Applied Biosystems® de Life Technologies™ Carlsbad, CA.USA) realiza es de cadena sencilla para la tipificación por detección fluorescente de STR's.

Los marcadores moleculares analizados fueron: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, Amelogenina (que revelará el sexo), D5S818 y FGA, los cuales son datos analizados a través del software GeneScan y Genotyper 2.5.2 obteniendo así un perfil genético.

Resultados

Se analizaron 38 huesos humanos de diferente edad y expuestos a diversas condiciones ambientales, recibidos en el periodo de 2005 al 2008. Los diferentes tipos de hueso fueron sometidos al mismo tren de lavado, todos se descalcificaron y se analizaron con el mismo kit de amplificación los resultados se muestran en las siguientes tablas 3 y 4.

Así mismo dentro del material biológico que se analizó se agruparon los huesos conforme a su edad cronológica de huesos con una edad aproximada de 20 a 30 años, de 20 a 35 años y en edad adulta de 40 años aproximadamente como se muestran en las siguientes figuras (7, 8, 9 y 10).

Tabla 3. Muestras analizadas.

No.	Clave interna del lab.	Hueso	Desconocido, Nombre, Indicio	Lugar de procedencia	de Perfil completo
1	58/04	Costilla der.	Desconocido 1	Zacapoaxtla	No
2	86/04	Costilla izq.	E.J. A	Puebla	No
3	96÷97/05	Fémur der.	Desconocido	Tehuacán	Si
4	151/05	Fémur der.	Desconocido 17	Tepeaca	Si
5	203/05	Tibia	Restos óseos	Teziutlán	No
6	121/06	Fémur der	Desconocido 3	Teziutlán	Si
7	150/06	Húmero der.	Desconocido X ò N.T.C	Xicotepec	Si
8	159/06	Fémur izq.	Desconocido 1	Piactla	Si
9	282/06	Húmero izq.	Indicio 4 ò M.D.M	Tlatlauquitepec	Si
10	289/06	Falange del pie der.	S.G. G	Huachinango	No
11	295/06	Fémur der.	Desconocido 1	Oriental	Si
12	333/06	Fémur izq.	Osamenta	Teziutlán	Si
13	350/06	Fémur izq.	E.A. B	Puebla	No
14	05/07	Fémur der.	Restos óseos	Huejotzingo	Si
15	07/07	Húmero izq.	Hueso humano	Chiautla	No
16	25/07	Fémur der.	Desconocido 4	Puebla	No
17	28/07 (P1)	Fémur izq.	Osamenta	San Pedro Cholula	No
18	28/07 (P2)	Cubito izq.	Osamenta	San Pedro Cholula	No

19	51/07	Húmero der.	Osamenta	San Pedro Cholula	Si
20	110/07	Húmero izq.	Osamenta	Izúcar	Si
21	111/07	Fémur der.	Restos óseos	Huachinango	Si
22	112/07	Húmero izq.	Desconocido 10	Atlixco	Si
23	115/07	Cráneo	Cráneo	Puebla	No
24	124/07	Cráneo	Sin nombre	Acatlán	No
25	184/07	Húmero izq.	V.J. F	Huachinango	Si
26	194/07	Cráneo	Osamenta	Izúcar	Si
27	196/07	Fragmento de costilla der.	E.S. S	San Martín	Si
28	197/07	Fémur der.	Restos óseos	Izúcar	Si
29	271/07	Fragmento de radio izq.	R.P.C	Libres	Si
30	290/07	Fémur izq.	Restos óseos	Tehuacán	Si
31	47/08	Fémur izq.	Indicio 1 y 2	Puebla	No
32	87/08	Fémur der.	Osamenta	Zacatlán	Si
33	96/08	Costilla	Osamenta	Tepeaca	No
34	159/08	Fémur der.	Desconocido 1	Chignahuapan	Si
35	355/08	Costilla	Desconocido 2	Chignahuapan	Si
36	378/08	Húmero izq.	Desconocido 36	Tehuacán	No
37	378/08	Húmero der.	Desconocido 37	Tehuacán	Si
38	397/18	Costilla	Desconocido 7	Atlixco	Si

Tabla en la cual se representan el total de las muestras analizadas, así como la clave interna del laboratorio, el tipo de hueso del cual se trabajó, el nombre que presentaba el mismo, su lugar de procedencia y la obtención del perfil genético completo.

Tabla 4. Características de las muestras analizadas.

No	Clave interna del lab.	Edad aproximada de la persona	Morfología	Talla del hueso	Observaciones
1	58/04	Joven 20-35 años	Calcificado	31.5 cm de largo por 1cm de ancho	En la parte central y final de la costilla tiene una apariencia grasosa
2	86/04	Joven 20-35 años	Calcificado	19 cm de largo por 1cm de ancho	Se encuentra fragmentada al final
3	96÷97/05	Joven 20-35 años	Calcificado	± 47 cm.	Hueso completo
4	151/05	Joven 20 -35 años	Calcificado	24cm	Hueso incompleto
5	203/05	Adulto 40 años	No calcificado	31cm	Se ve muy viejo, está muy poroso
6	121/06	Adulto 40 años	Calcificado	18.5 cm	Hueso incompleto
7	150/06	Joven 20-35 años	Calcificado	±168.7, 160.22 cm.	Hueso completo
8	159/06	Adulto 40 años	Calcificado	± 162.2 156.94 cm.	Hueso completo
9	282/06	Joven Menor de 18 años	Calcificado	± 161.10 152.62cm.	Hueso completo, Presencia de núcleos de crecimiento.
10	289/06	Joven 20-35 años	Calcificado	5 cm.	Hueso completo, pero se encontraba en formol

11	295/06	Joven 20-35 años	Calcificado	70cm	Hueso incompleto que presenta en unos de sus extremos restos de tejido y un material amarillo a lo largo del hueso
12	333/06	Joven 20-30 años	Calcificado	± 42*cm.	Hueso completo
13	350/06	Joven 20-30 años	Calcificado	± 50 cm.	Hueso completo
14	05/07	Adulto 30-40 años	Regularmente calcificado	± 38.5	Hueso incompleto
15	07/07	Adulto 30-40 años	Calcificado	±28*	Hueso incompleto
16	25/07	Joven 20-30 años	Calcificado	± 25.5 cm.	Hueso completo
17	28/07 (P1)	Joven 25-35 años	-	± 42 cm.	Huesos incompletos y quemados
18	28/07 (P2)	Joven 25-35 años	-	± 22.5cm.	Huesos incompletos y quemados
19	51/07	Joven 20-35 años	Calcificado	± 29.5 cm.	Hueso incompleto
20	110/07	Joven 20-30 años	Calcificado	± 28.5 cm.	Hueso incompleto
21	111/07	Adulto 30-40 años	Ligeramente calcificado	± 40cm.	Hueso incompleto tejido esponjoso sensible, se observa las trabéculas de Harvest,

					superficie del hueso más desgastado
22	112/07	Adulto 25-35 años	Calcificado	± 31 cm.	Hueso completo
23	115/07	Adulto 25-35 años	Calcificado	-	Hueso completo, muy sucio y olor putrefacto, no hay presencias de suturas marcadas en el cráneo.
24	124/07	Niña Menor de edad de 2 a 5 años	Bóveda craneal	AP 29.5 cm VP 18 cm	Hueso incompleto. Se observan las suturas coronal, frontoparietal y occipital, hueso incompleto 6 meses a la intemperie
25	184/07	Adulto 20-30 años	Calcificado	± 25 cm.	Hueso completo infiltrados hemáticos en porciones distales y proximales
26	194/07	Joven 20 – 30 años	Calcificado	AP 37 cm. VP 31 cm.	Hueso completo.
27	196/07	Joven 20-30 años	Calcificado	± 6 cm.	Hueso incompleto
28	197/07	Joven 15-30 años	Calcificado	± 38.5 cm.	Hueso incompleto
29	271/07	Joven 20-30 años	Calcificado	± 12 cm.	Hueso incompleto
30	290/07	Joven 20-35 años	Calcificado	± 48 cm.	Hueso completo

31	47/08	Joven 20-35 años	Calcificado	18.5 *cm.	Hueso incompleto presentaba restos de cal
32	87/08	Joven 20 -30 años	Calcificado	30cm	Hueso incompleto
33	96/08	Joven 20 – 30 años	Calcificado	15cm	Hueso incompleto
34	159/08	Joven 20 – 30 años	Calcificado	37* cm	Hueso completo
35	355/08	Joven 20 – 30 años	Calcificado	17cm de largo por 1cm de ancho	Hueso incompleto
36	378/08	Joven 20-35 años	Calcificado	28cm	Hueso completo
37	378/08	Joven 20-35 años	Calcificado	30cm	Hueso completo
38	397/08	Joven 20 - 30 años	Calcificado	35 cm	Hueso completo

Nota. Se clasifican las muestras analizadas en su tamaño, edad y considerando si están completos los huesos.



Figura 7.- Material Biológico de estudio 1. Se clasificaron los huesos conforme a la edad mostrada en la tabla 4. Donde se muestran diferentes tipos de huesos como son costillas, falange, radio y cráneo con una edad aproximada de 20 a 30 años.



Figura 8.- Material Biológico de estudio 2. Como se puede observar en las imágenes expuestas de huesos conforme a la edad mostrada en la tabla 4. Que muestran diferentes tipos de huesos como son huesos largos y una osamenta con restos calcinados con una edad aproximada de 20 a 30 años

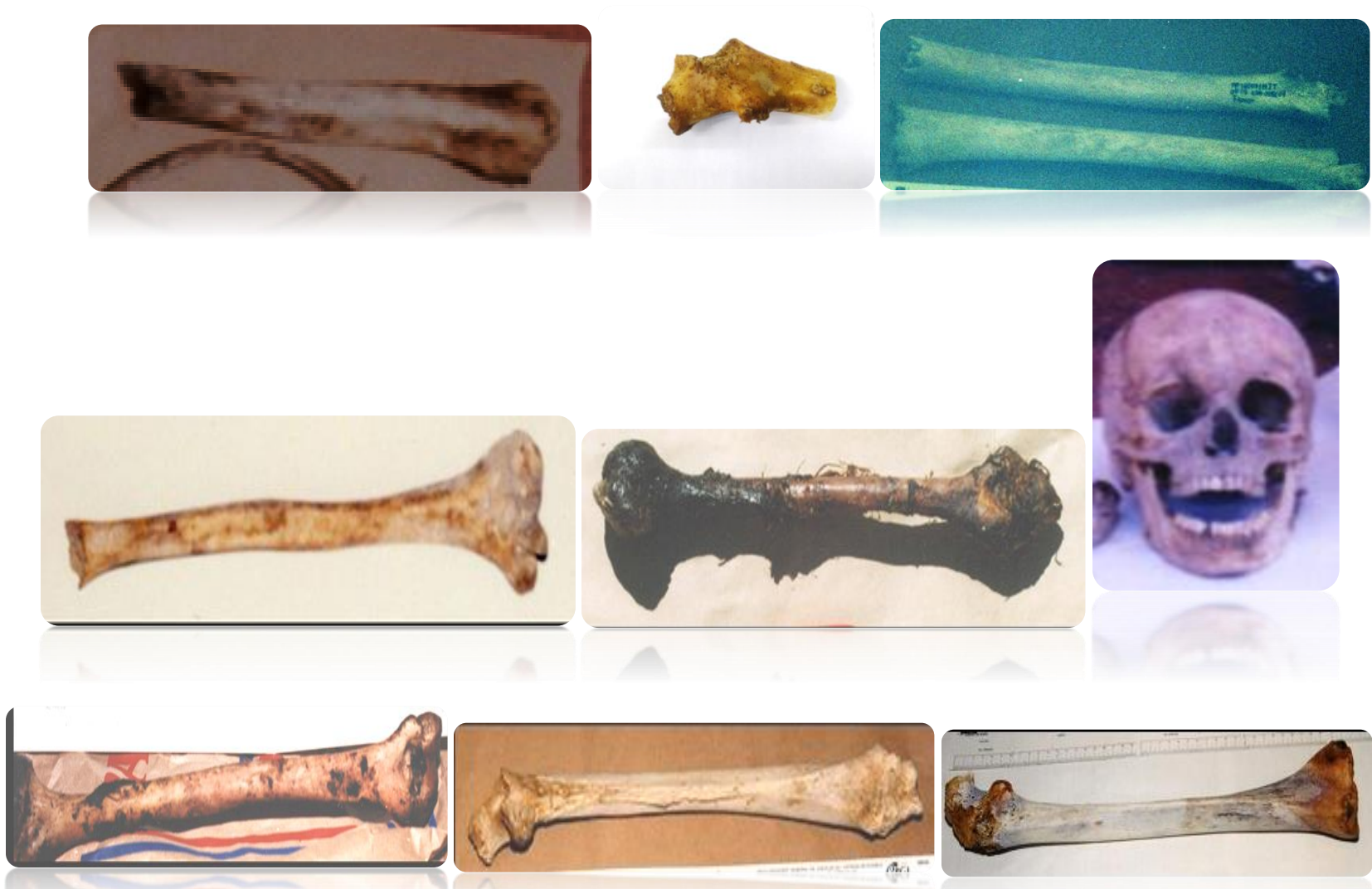


Figura 9.- Material Biológico 3. Como se puede observar en estas imágenes son de huesos con una edad adulta aproximadamente 40 años y son diversos tipos de hueso como son Tibia, cráneo, húmero y fémur.



Figura 10.- Material Biológico 4. En estas imágenes se muestran huesos largos como son en su mayoría fémur y húmero, clasificándolos con una edad cronológica de aproximadamente 20 a 35 años.

También dentro de las muestras analizadas se observó que los huesos que mejor obtención de perfil genético completo, fueron en un porcentaje del 80 al 100% el fémur, en segundo lugar, fue con un 70 - 60% el húmero y con pocas probabilidades de obtener un resultado óptimo fueron los pocos huesos procesados como son el cráneo, como se ilustra en la siguiente figura 11.

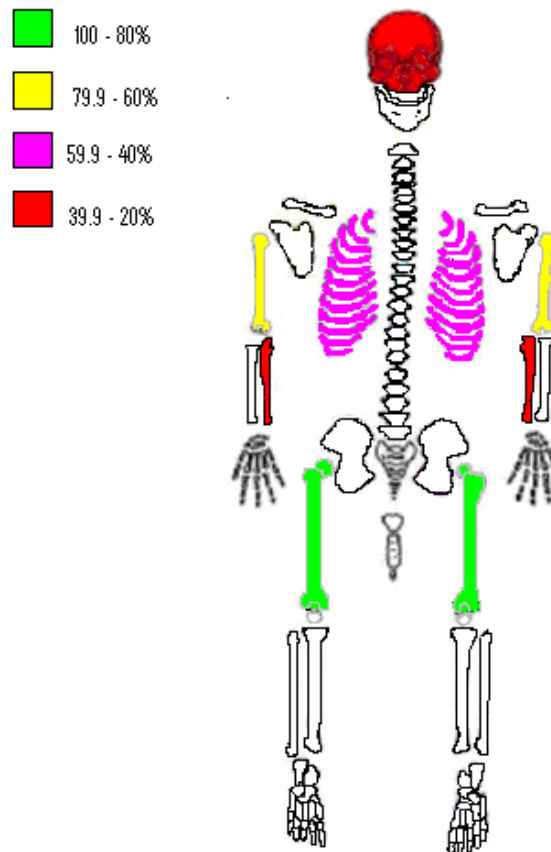


Figura 11.- Representación de la prioridad de la selección de huesos. Imagen en la que se observa en primer orden para la obtención de un perfil genético completo en primer lugar el fémur con un 100%, en segundo es el húmero con un 79% y con pocas probabilidades de un perfil genético completo es el cráneo con un 39%, debido a que tanto los osteocitos como los osteoblastos son células nucleadas y su número oscila entre 20.000 y 26.000 por mm^3 en el hueso compacto que presentan los huesos largos, esta conservación se explica por la menor concentración de agua y enzimas que hay en este tipo de tejidos y por la protección de la que gozan frente a la agresión física y bioquímica de microorganismos (la imagen es tomada de Edson *et al.*, 2004).

De igual forma el ADN genómico extraído de cada hueso que se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, mostraron un barrido como señal de degradación en la mayoría de ellos, en otros no se observó nada y solo en pocas muestras se mostró integro (Figura 12).

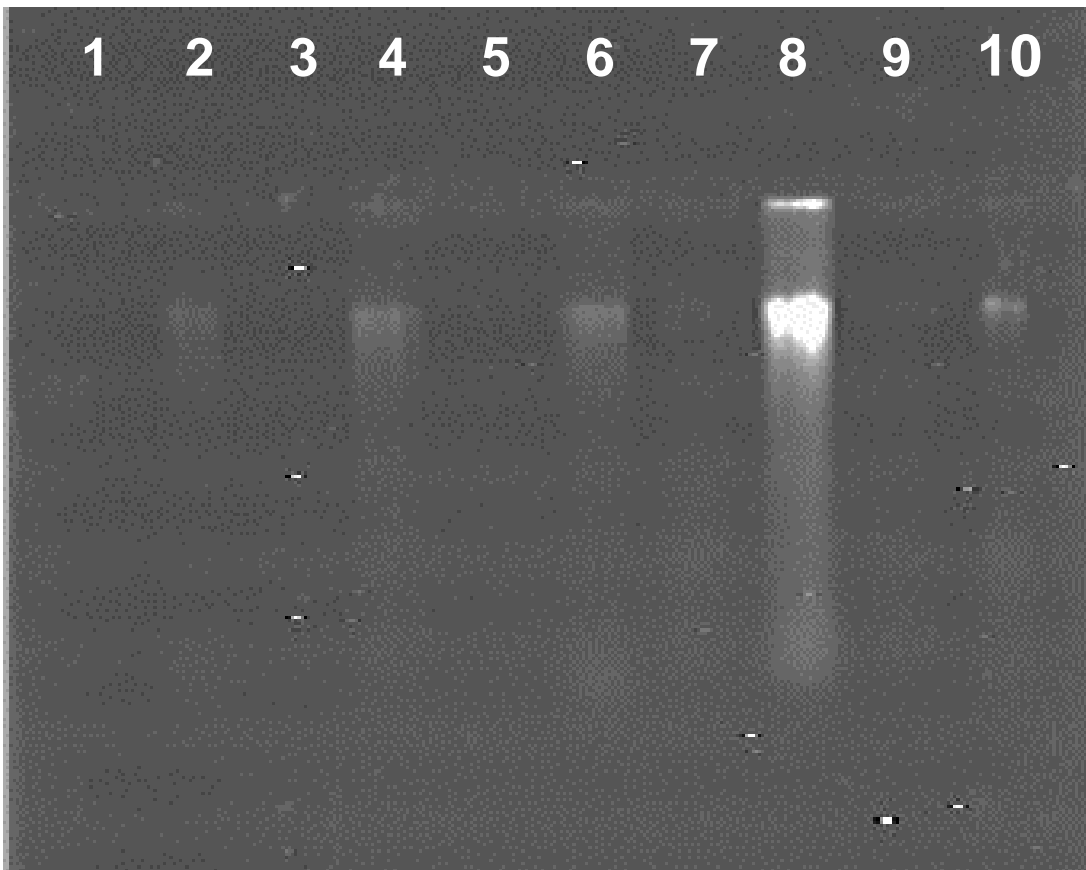


Figura 12.- Electroforesis de los productos de extracción por la técnica fenol-cloroformo- alcohol isoamílico. Se muestra que en el carril 8 hay mayor cantidad cualitativa de ADN con respecto a los demás carriles.

Las muestras que se cargaron en el gel de agarosa (figura 12), fueron de diferentes tipos de hueso y año (tabla 5) en el carril 8 se presenta una cantidad cualitativa mayor de ADN con respecto a los carriles 2, 3, 4, 6, 7 y 10 que hay poca presencia de ADN, sin embargo, se aprecia un barrido a lo largo de los carriles dentro de los mismos, por el contrario, en los carriles 1, 5 y 9 no se aprecian ninguna banda.

Tabla 5. – Muestras depositadas en el gel de agarosa

Carril	Hueso	Año	Perfil
1	Control negativo	---	No
2	Fémur	2006	Si
3	Cubito	2007	No
4	Húmero	2008	Si
5	Tibia	2005	No
6	Húmero	2006	Si
7	Costilla	2008	Si
8	Fémur	2008	Si
9	Falange	2006	No
10	Control positivo	2007	Si

Nota. Se observan en la tabla las diferentes muestras analizadas como son el tipo de hueso, año y la obtención de un perfil genético.

En las muestras de los carriles 4, 6, 7, 8 y 10 se obtuvo un perfil completo y en el carril 2 el perfil que se obtuvo fue incompleto debido a que los fragmentos de ADN más largos están más degradados y por lo cual su amplificación es incompleta que a aquellos fragmentos cortos que son los primeros en amplificarse.

Una vez amplificado el ADN de las muestras óseas procesadas, en los fragmentos resultantes que son marcados con etiquetas fluorescentes, para posteriormente ser separados en función de su tamaño por medio de la electroforesis capilar. La información recogida durante la electroforesis es procesada por el software GeneScan y Genotyper

2.5.2, obteniendo el electroferograma que es un patrón de picos y valles donde está contenida la información necesaria para la construcción del perfil genético.

Cada grupo de picos corresponde a los marcadores moleculares analizados D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, Amelogenina (que revelará el sexo), D5S818 y FGA, detectaron ADN humano obtenido de las muestras óseas que se procesaron, cada pico contenido en un marcador corresponde a un alelo.

El alelo asociado a cada pico es determinado por el software, que contiene información acerca de las diferentes longitudes, que puede presentar los marcadores. Como la longitud depende de las repeticiones en tándem (STR), la distribución de longitudes es discreta.

Cada uno de los picos presentes en el electroferograma, además de determinar el perfil genético, aporta más información:

Número de picos.

Un pico= la persona es homocigota en ese alelo.

Dos picos= la persona es heterocigótica en ese alelo.

Tres picos o más = posible mezcla o contaminación de prueba.

Posición del pico. Los alelos más pequeños se encuentran a la izquierda del electroferograma mientras que los más grandes se situarán en la parte derecha.

Altura del pico. Será proporcional a la cantidad de ADN contenida en la muestra

Eje vertical: RFUs (Relative Fluorescent Units) unidad de medida de la intensidad de la luz captada por la cámara CCD.

En segundo lugar, se observa mucha intensidad de luz de diferentes colores. Esta luz se corresponde con los primers utilizados durante la amplificación PCR. Finalmente, se observa un patrón de picos y valles, que es donde realmente está contenida la información necesaria para la construcción del perfil genético.

Tras el análisis llevado a cabo por el software, se separan los picos en función del color, dando lugar a diferentes electroferogramas, en las figuras 13 y 14 se puede mostrar la presencia de 16 loci. El ordenador ha separado los marcadores en cuatro colores: azul, verde, amarillo (visto en negro por visibilidad) y rojo, concretamente en color azul se detectó 4 marcadores, en color verde se detectó 5 marcadores, en color amarillo se detectó 4 marcadores y 3 marcadores en color rojo. Cada marcador tiene un nombre determinado, que sirve para distinguir unos de otros y cada pico contenido en un marcador corresponde a un alelo.

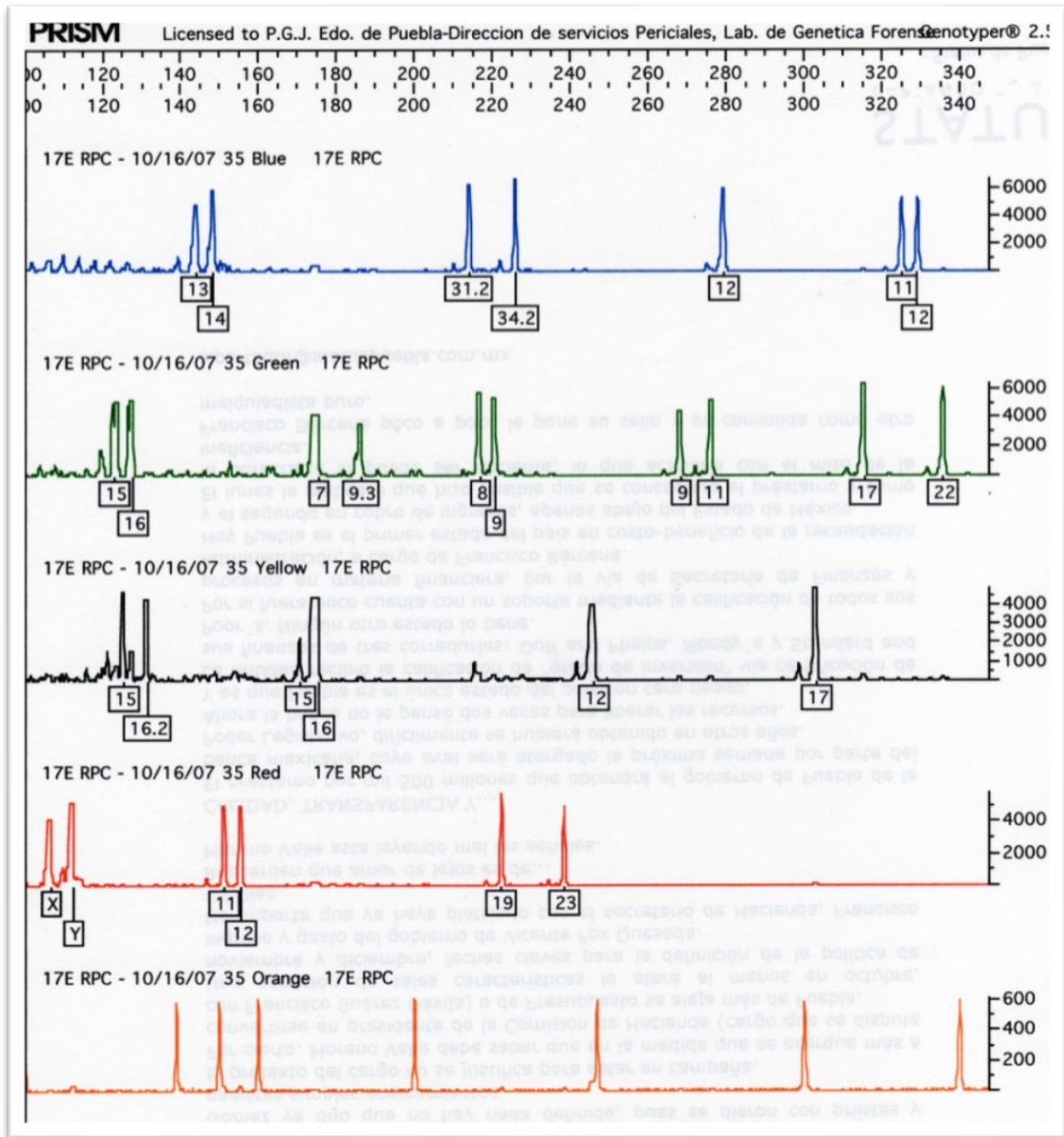


Figura 13.- Perfil genético obtenido por la técnica fenol-cloroforno- alcohol isoamílico. Se muestra el perfil genético completo con los 15 marcadores moleculares más la proteína amelogenina de la muestra cargada en el gel de agarosa del carril 8. El tamaño (pb) de cada alelo (pico) que se muestra en la parte superior. Debajo de cada pico se indican los alelos para cada STR. Para amelogenina se muestra el genotipo XY (varón). La medida del pico en RFUs se muestra en el eje de las Y, también se observa que los picos corresponden a los marcadores analizados empezando de izquierda a derecha corresponden de la siguiente manera: En azul D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, en verde D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, en amarillo (visto en negro por visibilidad) D19S433, VWA, TPOX, D18S51, en rojo Amelogenina (que revelará el sexo), D5S818, FGA y en naranja está el LIZ size estándar GS500.

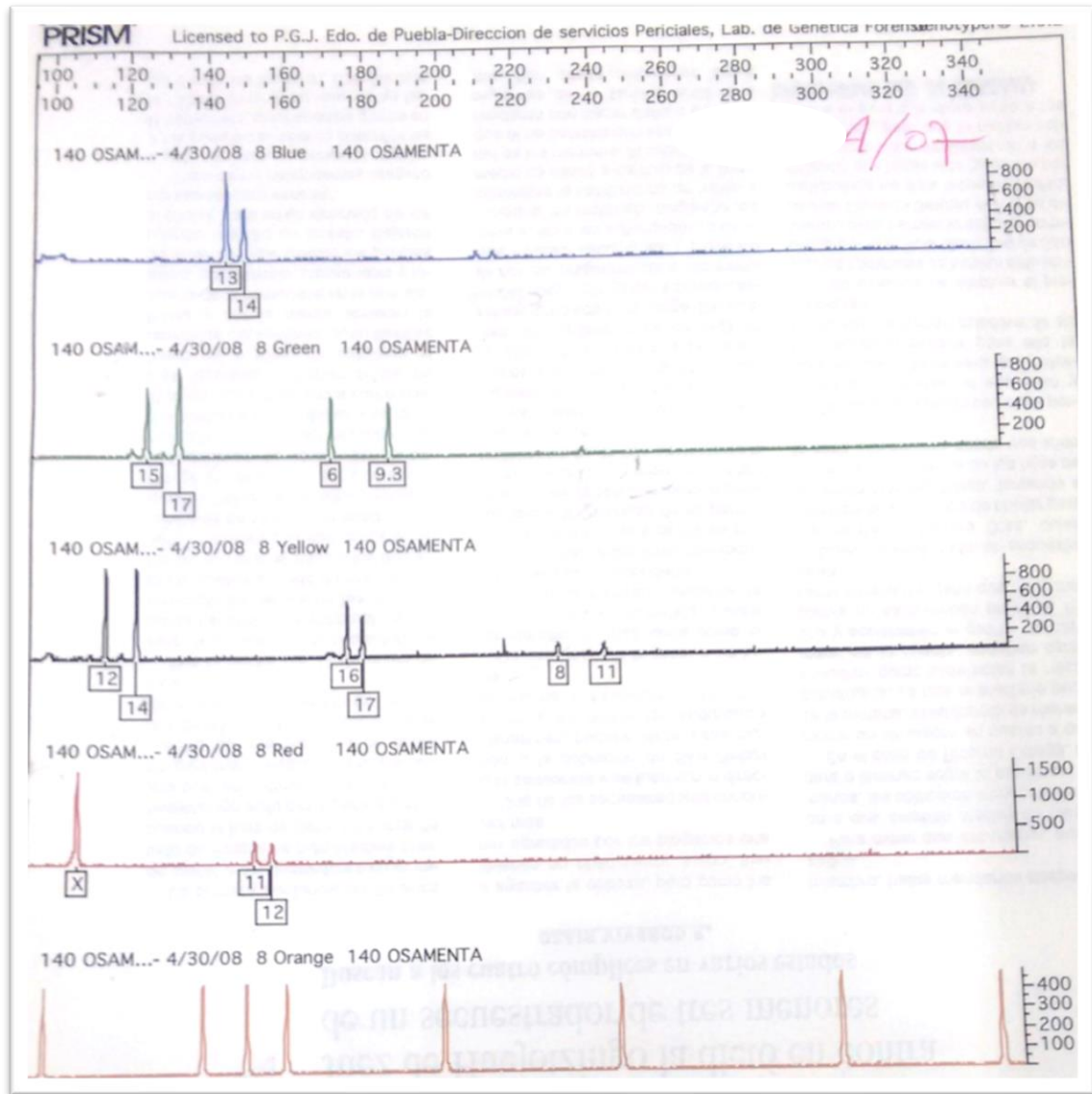
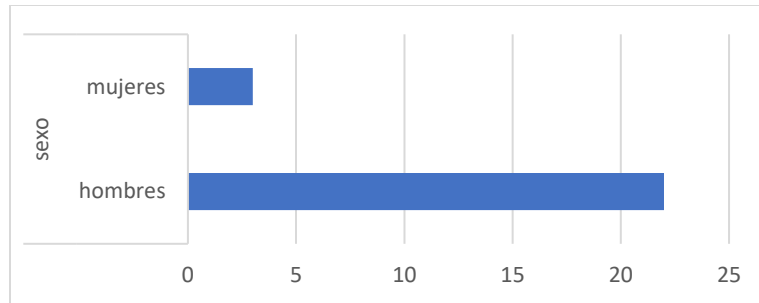


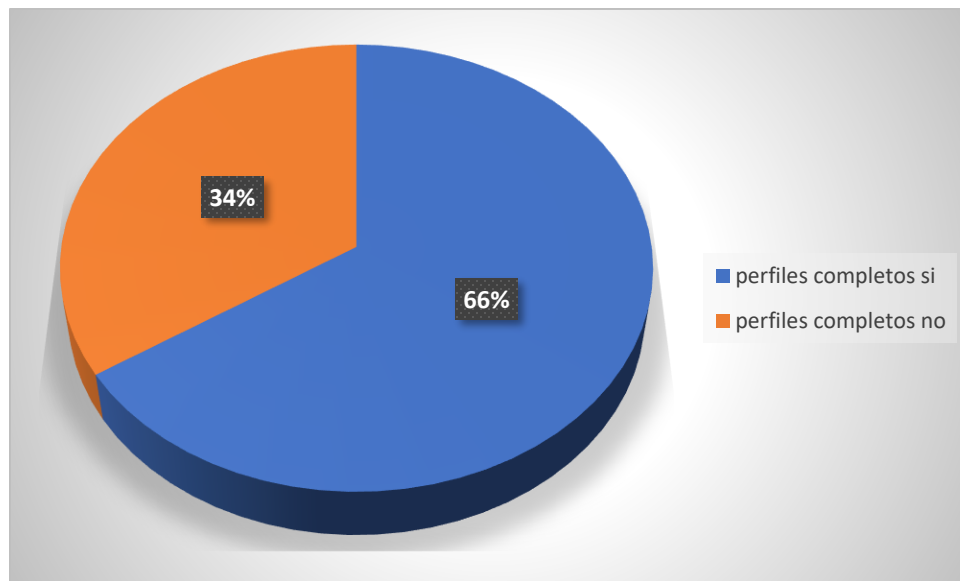
Figura 14.- Perfil genético obtenido por la técnica fenol-cloroformo- alcohol isoamílico. Se muestra un perfil genético incompleto sin todos los picos en los 15 marcadores moleculares más la proteína amelogenina de la muestra cargada en el gel de agarosa del carril 2.

En cuanto al sexo que presentaron las muestras analizadas de perfiles completos la mayoría fue del sexo masculino como se observa en la gráfica 1.



Gráfica 1.- Sexo, Como se muestra en la gráfica el sexo masculino fue el más predominante en los perfiles completos obtenidos.

También del total de huesos analizados, en 25 muestras se obtuvo un perfil genético completo con un porcentaje del 66%, el resto fueron perfiles incompletos y otros sin obtención de ningún resultado, esto puede deberse a las condiciones ambientales bajo las cuales estuvieron expuestas, o debido a que fue el único ejemplar, así como la cantidad de muestra que presento para trabajar. Como se muestra en la gráfica 2.



Gráfica 2.- Porcentaje de perfiles completos y parciales. Como se muestra en la gráfica donde el 34 % de perfiles genéticos no completos se debió a que algunas muestras en el tipo de condiciones ambientales en donde se encontraron influenciaron en la presencia de inhibidores, así como la única muestra para trabajar.

Discusión

En los presentes estudios de Vullo *et al.*, 2019, Catelli *et al.*, 2019, Latham & Miller 2019 y Siriboonpiputtana *et al.*, 2018 en los criterios de muestreo óseo expuestos a diferentes condiciones como humedad, temperatura, pH, microorganismos y diferentes tipos de suelo que pueden producir diversos grados de conservación a lo cual influyen en la cantidad y calidad del ADN.

De la misma forma, se realizó una selección de huesos largos entre los más destacados fueron Fémures y Húmeros almacenados en el laboratorio de Genética Forense de la Fiscalía General de Justicia del Estado de Puebla que presentaron conforme a sus características morfológicas una buena conservación, ya que con la metodología empleada de extracción y purificación en el presente trabajo al seleccionar ese tipo de muestras se observó un perfil genético con un mayor número de marcadores STR a diferencia de otro tipo de huesos.

Por otra parte el método de extracción que se utilizó para este estudio fue semejante al trabajo por Samsuwan *et al.*, 2018 , donde trabajó muestras de huesos y dientes porcinos utilizando el método estándar de fenol-cloroformo sin ninguna diferencia en la calidad del ADN extraído de huesos y dientes.

Cabe considerar que en la comparación de las metodologías empleadas por, Rothe & Nagy, 2016 y Uzair, Rasool, & Wasim, 2017 que presentan cada uno en la utilización de diferentes métodos de extracción y purificación, mencionan que el método de extracción orgánica da mejor resultado con un mayor rendimiento de ADN.

Sin embargo en las técnicas utilizadas en los estudios de Siriboonpiputtana *et al.*, 2018 y Desmyter *et al.*, 2017 donde ambos utilizan perlas de sílice, y uno de ellos realiza un método combinado con la extracción orgánica en los lisados óseos y lo mejora con la purificación del ADN con perlas de sílice concluyen el éxito de sus resultados con perfiles de ADN tanto completos como parciales en un 80%.

No obstante que en el presente trabajo se puede observar que los resultados que ellos obtienen en comparación con los nuestros es de un 20% de diferencia, pero para muestras difíciles las perlas de sílice tienen un mayor riesgo de coextracción de impurezas que pueden actuar como inhibidores más que en nuestra metodología empleada.

Finalmente, para el tipo de estudio de Sierra *et al.*, 2017 la importancia que el realiza fue el protocolo unificado de digestión y descalcificación para tres métodos diferentes de extracción de ADN de tejido mineralizado: partículas orgánicas (fenol-cloroformo), sílice (QIAquick, QIAgen) y magnéticas (Prepfilier Express TM BTA Forensic DNA Extraction Kit).

De igual modo en este trabajo se realizó la importancia de la descalcificación previa a la digestión en todas las muestras analizadas lo cual permitió una completa degradación del polvo de hueso y una recuperación de ADN.

Sin embargo, uno de los inconvenientes del método propuesto es que implica un poco más de tiempo en la preparación de la muestra ósea en la descalcificación y parte de la extracción en comparación con las técnicas automatizadas usadas actualmente, debido al aumento de manipulación por parte del investigador que puede llevarse contaminación de otras fuentes.

Además, en el presente trabajo se obtuvo resultados positivos con la ventaja en la utilización del método propuesto para la obtención de perfiles genéticos completos, ya que influye desde el tipo de muestra de hueso para analizar y que este se encuentre con una mejor conservación frente a la degradación gracias a la unión entre moléculas de ADN y cristales de hidroxiapatita (presentes en hueso), que dan una mayor eficiencia en cuanto a cantidad disponible para amplificación añadiendo una fase de purificación posterior a la extracción que consiste en usar unos filtros especiales que nos permiten concentrar ADN extraído, obteniéndose una solución más pura, además, por el bajo coste y rápido.

Conclusiones

En este trabajo se evaluó y desarrolló la eficiencia del método de extracción orgánica fenol-cloroformo y purificación de los extractos genómicos de ADN a partir de restos óseos humanos con Microcon-100 (Millipore, Billerica, MA, USA) para el estudio de los polimorfismos, mediante el kit de amplificación *Identifiler* (16 STR).

Se clasificó las muestras óseas analizadas en: tipo de hueso, lugar de procedencia, tamaño, morfología y edad, eligiendo las muestras más representativas para el estudio como el fémur, húmero y tibia. En el lugar de procedencia los lugares más repetitivos fueron Puebla y Tehuacán, en el tamaño la mayoría se obtuvo completos y calcificados solo unos pocos se encontraron incompletos y en mal estado, en la edad la mayoría fueron jóvenes de un rango de 20 a 35 años.

Sin embargo, se comparó la obtención de perfiles genéticos completos, según la prioridad de selección de huesos que en su mayoría fueron fémur, tibia y húmero teniendo en cuenta que este tipo de muestras para trabajar presenta mayor cantidad de hueso y a su vez eficientes para la obtención de un perfil genético completo.

Bibliografía

- Alonso A, M. P., C, A., P, G., O, G., L, F., J, G.-H., . . . Fernández-Piqueras. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic SCI International*, 141-149.
- Alonso, A. A. (2004). Conceptos básicos de ADN forense. *Nuevas técnicas de investigación del delito: Intervenciones Corporales y ADN*, 1860-1871.
- Barrio, P. A. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Española de Medicina Legal*, 54-62.
- Butler, J. M. (2011). *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Academic press.
- Catelli, L., Romero, M., Rocha, A., Romanini, C., & Vullo, C. (2019). Análisis STR de restos óseos exhumanos de un "pozo de agua" seco utilizado como entierro clandestino masivo en Argentina. *Forensic Science International*, 112-114.
- Desmyter, S., De Cock, G., Moulin, S., & Noël, F. (2017). Organic extraction of bone lysates improves DNA purification with silica beads. *Forensic Sci Int*, 96-101.
- Edson, S., Ross, M., Coble, T., Parsons, & S.M, B. (2004). Naming the dead-confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Central police university press*, 1-28.
- Garrido, R. M. (2017). Satellite DNA: an evolving topic. *Genes*, 230.
- González, F., Sánchez, D., & Martínez, B. (2005). El estudio de polimorfismos de ADN a partir de restos óseos y dientes y sus aplicaciones en la identificación de desaparecidos. *Medicina Legal*, 163-182.
- Latham, K. E., & Miller, J. J. (2019). DNA recovery and analysis from skeletal material in modern forensic contexts. *Forensic Sci, Res.*, 51-59.
- Lewontin, R. (2001). *Genes, organismo y ambiente*. Gedisa.

- Lorente. (2004). *Un detective llamado ADN: tras las huellas de criminales desaparecidos y personajes históricos*. España: Temas de Hoy.
- Lorente. (2007). Identificación Genética de los restos de la familia de Colón. *Medicina balear*, 43-65.
- Lorente, J. A., Vega, N. M., & Rosas, S. G. (2007). Genética Forense La Ciencia al Servicio de la Justicia. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXXI.
- Martínez. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes I tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen*, 332-335.
- Olivia, S. (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *Offarm: farmacia y sociedad*, 122-126.
- Prieto. (2004). *Tesis de doctorado Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estra*. España: Universidad Complutense de Madrid.
- Rangel, H. (2010). La Prueba de Paternidad con ADN. *Noticonaquic*, 40-51.
- Rothe, J., & Nagy, M. (2016). Comparación de dos métodos de métodos de extracción basados en sílice para el aislamiento de ADN de huesos. *Medicina legal*, 36-41.
- Samsuwan, J., T, S., T, A., T, S., P, P., A, S., & N, M. A. (2018). A method for extracting DNA from hard tissue for use in forensic identification. *Biomed Rep*, 433-438.
- Sierra, W., del Castillo-Sabogal, H., & Espitia-Ortiz, T. (2017). Protocolo unificado de digestion y descalcificación de tres métodos de extracción de ADN de restos humanos. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 447-455.
- Siriboonpiputtana, T., Rinthachal, T., Shotivaranon, J., Peonim, V., & Rerkamnuaychoke, B. (2018). El análisis Genético Forense de huesos siguen siendo muestras. *Ciento Forense International*, 167-175.
- Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (2000). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México: Medica panamericana.

- Uzair, A., Rasool, N., & Wasim, M. (2017). Evaluation of different methods for DNA extraction from human burnt bones and the generation of genetic profiles for identification. *Med Sci Law*, 159-166.
- Vullo, C., Rocha, A., Romanini, C., Romero, M., Catelli, L., Rotondo, M., & Longaray, M. (2019). Criterios de muestreo óseo para la genotipificación del ADN: categorización macroscópica de muestras y resultados de la tipificación STR. *Forensic Science International: Serie de Suplementos Genéticos*, 760-762.
- Winslow, T. (2018). Adenocarcinoma of the Esophagus Stages. *For the National Cancer Institute*.

Anexos.

Anexo 1 Reactivos

En el desarrollo experimental se utilizaron los siguientes reactivos que se detallan a continuación en orden alfabético y con su respectiva procedencia:

Acetato de sodio (Aldrich)

Ácido acético glacial (J. T. Baker)

Ácido bórico (Reasol)

Ácido clorhídrico (Aldrich)

Agarosa (CONDA pranadisa)

Alcohol absoluto (J.T. Baker)

Alcohol isoamílico (J.T. Baker)

Azul de bromofenol (Sigma - Aldrich)

Bromuro de etidio (Aldrich)

Cloroformo (J. T. Baker)

Cloruro de sodio (J. T. Baker)

Fenol (Aldrich)

Formamida (ABI Applied)

Glicerol (Sigma)

Hidróxido de sodio (J. T. Baker)

Marcador de peso molecular (Liz ABI Applied)

Membrana Millipore tipo microcon (Millipore, Ltd.)

Oxalato de amonio (J. T. Baker)

Tetra-acetato de etilendiamino (EDTA) (J. T. Baker)

Trizma (Sigma)

ANEXO 2 Preparación de reactivos

EDTA 0,5M pH: 8

Disolver 186,1 gramos de EDTA disódico en 800 ml de agua destilada. Agregar lentejas de hidróxido de sodio hasta pH: 8, con agitación constante. Llevar a Vf: 1000 ml.

OXALATO DE AMONIO.

Disolver 10 gramos de oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada y ajustar a un pH: 3 con HCl, llevar a Vf:100ml

ACETATO DE SODIO 3M

Disolver 20.4 grs de acetato de sodio en 40ml de agua destilada, ajustar a un pH 5.2 con HCl y llevar a un Vf: 50ml

TRIS/HCl 1M pH: 8

Disolver 121,1 gramos de tris base en 800 ml de agua destilada. Ajustar a pH 8 por agregado de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a Vf: 1000 ml.

FENOL (Solución)

Fundir a baño maría el fenol sólido y llenar hasta la mitad un frasco color caramelo con el líquido resultante. Agregar 1 volumen de TRIS/HCl 1M pH: 9. Agitar bien hasta

que se forme una emulsión, decantar hasta observar las dos fases y descartar la parte acuosa. Agregar nuevamente TRIS/HCl 1M pH: 8 y repetir el proceso varias veces, hasta que la fase acuosa conserve el pH deseado (8). Conservar en solución de TRIS/HCl 0.1M.

FENOL/CLOROFORMO/ISOAMILICO

Mezclar 25ml de fenol, 24ml de cloroformo con 1ml de alcohol isoamílico; agregar 1 volumen de Tris HCl pH 8 0.1M y agitar vigorosamente. Conservar en refrigeración y cubrirlo para evitar su oxidación.

SDS 20%

Disolver 20 grs de dodecil sulfato de sodio en 80 ml de agua caliente. Ajustar a pH 7,2 por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Llevar a Vf: 100ml.

TBE 10X

Disolver 108 grs de tris base, 55 grs de ácido bórico y 7,4 grs de EDTA disódico en agua destilada. Llevar a Vf: 1000 ml.

BROMURO DE ETIDIO

Tomar 20µl de bromuro de etidio de la solución ya preparada y disolver en 50ml, para el teñido de los geles. **IMPORTANTE:** poderoso mutagénico, usar guantes descartables.

Buffer de Azul de Bromofenol 6 X

Disolver 25mg de Azul de Bromofenol en 3ml de Glicerol y aforar a 10 ml con agua destilada.