

INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGIA

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD

**COMPARACION DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE
ADN DE RESTOS OSEOS.**
**COMPLEJO DE CIENCIAS FORENSES DEL ORGANISMO DE INVESTIGACION
JUDICIAL, HEREDIA**

Christian Del Valle Sibaja

CARTAGO, 2002

COMPARACION DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE ADN DE RESTOS OSEOS

Christian Del Valle Sibaja¹

RESUMEN

La extracción de ADN amplificable es un problema frecuente en las muestras degradadas de tipo forense, especialmente en los huesos. El poder obtener la mayor cantidad de información posible de estas muestras es muy importante a nivel legal. El presente estudio trata de encontrar el método que proporcionó las mejores condiciones de extracción de ADN amplificable a partir de restos óseos. Se compararon tres métodos de extracción fenólica en seis huesos de diferente procedencia. Los tres métodos utilizados son: el usado por la Universidad de Santiago de Compostela, el usado en el OIJ y el del FBI.

En la comparación se tomó en cuenta la cantidad de ácidos nucleicos extraídos, la amplificación de STR's y Amelogenina por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el contexto ambiental en el que se encontraba la muestra y la presencia de inhibidores de PCR.

Se encontró pequeñas diferencias entre los métodos, pero es el contexto de las muestras lo que afecta la cantidad y calidad del ADN. Se obtuvo mejores resultados de amplificación de Amelogenina que de STR's en todos los métodos. El método del FBI es el que presentó las mejores las mejores condiciones de ADN amplificable aún cuando no fue el método que extrajo la mayor cantidad de ADN. El método usado en la Universidad de Santiago de Compostela es el que presentó la mayor cantidad de contaminantes y los resultados más pobres de amplificación.

El éxito de amplificación depende de una remoción efectiva de los contaminantes inhibidores de PCR.

¹ Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2002.

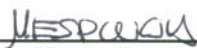
COMPARACION DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE ADN DE RESTOS OSEOS

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal



Johnny Peraza,
Profesor Guía



Dra. Marta Espinoza,
Representante de la Empresa



Dra. Anayanci Rodríguez,
Lectora

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos
quienes me apoyaron durante mis
estudios.

Christian

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Espinosa y al Complejo de Ciencias Forenses en general por haberme brindado la oportunidad de hacer la práctica de especialidad, así mismo por el apoyo financiero y logístico para la ejecución del proyecto.

A los miembros del Departamento de Bioquímica, por los conocimientos que me transmitieron en la materia, también por su paciencia.

Al Dr. Luis Del Valle por los conocimientos que enriquecieron este trabajo y su apoyo.

A Ana Morales, Anayanci Rodríguez, Gladis Núñez, Silvia Fallas, Concepción Morelli y Jose Luis Peraza por su dedicación en el entrenamiento que me brindaron, en las labores del laboratorio, que influyeron grandemente en este trabajo.

A mi padre Gerardo Del Valle y mi hermana Mónica Del Valle y a Irene Jiménez por su gran ayuda.

A Maira Cartín de la Escuela de Medicina de la UCR y a Francisco Monge del ITCR por su ayuda en materia de estadística.

A mi querida madre por todo su amor y apoyo en mis 24 años.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su guía, su paciencia, sus aportes y sugerencias durante la práctica.

INDICE GENERAL

RESUMEN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iv</i>
INDICE GENERAL	<i>v</i>
INDICE DE TABLAS	<i>vii</i>
INDICE DE GRAFICOS	<i>viii</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>ix</i>
INDICE DE ANEXOS	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	<i>11</i>
MARCO TEÓRICO	<i>14</i>
Fundamentos básicos	<i>14</i>
Restos óseos como fuente de ADN	<i>15</i>
Obtención de ácidos nucleicos	<i>17</i>
Cuantificación de ácidos nucleicos	<i>18</i>
Cuantificación Espectrofotométrica	<i>19</i>
Cuantificación por Hibridación con una sonda	<i>19</i>
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	<i>21</i>
Secuencias cortas repetidas en tandem (STR's)	<i>22</i>
Amelogenina	<i>24</i>
Electroforesis	<i>25</i>
MATERIALES Y METODOS	<i>26</i>
Selección de muestras	<i>26</i>
Extracción de ADN	<i>26</i>
Cuantificación de Ácidos Nucleicos	<i>30</i>
Amplificación (montaje de PCR)	<i>30</i>
Electroforesis en Poliacrilamida con Tinción de Plata	<i>30</i>
Búsqueda de Inhibidores de PCR	<i>30</i>
Análisis de las muestras	<i>31</i>
RESULTADOS	<i>32</i>
DISCUSION	<i>38</i>
Análisis de cuantificación entre los métodos	<i>38</i>
Análisis de amplificación entre los métodos	<i>46</i>
Análisis de la influencia del contexto de las muestras sobre los extractos	<i>51</i>
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	<i>60</i>

Conclusiones	60
Recomendaciones.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXO.....	64
<i>Modificación del protocolo de Extracción de ADN de restos óseos según el FBI (1998) (Acondicionado al laboratorio de Ciencias Forenses del OIJ).....</i>	<i>65</i>
<i>Extracción fenólica de ADN a partir de restos óseos (OIJ)</i>	<i>67</i>
<i>Extracción fenólica de ADN utilizada en la Universidad de Santiago de Compostela</i>	<i>69</i>
<i>Protocolos de amplificación para STR y Amelogenina utilizados en el Termociclador GeneAmp 9700 del Laboratorio de Bioquímica del Complejo de Ciencias Forenses del OIJ.</i>	<i>71</i>
<i>Procedimiento resumido de cuantificación de ADN (método de Quantiblot).....</i>	<i>72</i>
ESTADÍSTICA.....	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados obtenidos de la cuantificación de ácidos nucleicos	32
Tabla 2. Resultados de la amplificación de STR's, Amelogenina e Inhibidores.....	34
Tabla 3. Resultados de la cuantificación en el GeneQuant.....	37
Tabla 4. Resumen	75

INDICE DE GRAFICOS

Núm.	Título	Pág.
1.	Comparación de las medias cuantificadas por el método de DyNA Quant 200 según el método de extracción utilizado.	39
2.	Comparación de las medias cuantificadas por el método de DNA Strips según el método de extracción utilizado.	40
3.	Comparación de las medias cuantificadas por el método de Quantiblot según el método de extracción utilizado.	41
4.	Comparación de las medias de ARN presente según el método de extracción utilizado.	43
5.	Comparación de las medias de proteínas presentes según el método de extracción utilizado.	43
6.	Comparación de las medias del porcentaje de pureza según el método de extracción utilizado.	44
7.	Comparación entre los diferentes métodos de extracción según los porcentajes de amplificación positiva y negativa	46
8.	Comparación entre los diferentes métodos de extracción según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de Amelogenina.	47
9.	Comparación entre los diferentes métodos de extracción según los porcentajes de amplificación positiva y negativa en la búsqueda de inhibidores.	48
10.	Comparación de las medias cuantificadas por el método de DyNA Quant 200 según el contexto de las muestras.	51
11.	Comparación de las medias cuantificadas por método de DNA Strips según el contexto de las muestras.	52
12.	Comparación de las medias cuantificadas por el método de Quantiblot según el contexto de las muestras.	53
13.	Comparación entre los diferentes contextos, según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de STR's.	55
14.	Comparación entre los diferentes contextos, según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de Amelogenina.	56
15.	Comparación entre los diferentes contextos, según los porcentajes de amplificación positiva y negativa en la búsqueda de inhibidores.	57

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Absorbancia del ADN monocatenario y bicatenario	19
2	Membrana de cuantificación (Quantiblot)	20
3	Termociclador 9700	21
4	Equipo básico de electroforesis	25
5	Limpieza exterior de un fémur	26
6	Remoción de la médula del fémur	27
7	Discos cortados de la parte central del fémur	27
8	Freezer/Mill	28
9	Cristales observados en las muestras extraídas por el método de Santiago de Compostela	33
10	Ejemplo de un gen de poliacrilamida. Corrida de STR para la muestra AF1. Se muestran las diferentes diluciones realizadas.	35
11	Corrida de Amelogenina para las tres repeticiones de la muestra B, extraídas por el método del OIJ	35
12	Corrida de inhibidores de PCR para la muestra C y D	36

INDICE DE ANEXOS

<i>Modificación del protocolo de Extracción de ADN de restos óseos según el FBI (1998)</i>	<i>65</i>
<i>Extracción fenólica de ADN a partir de restos óseos (OIJ)</i>	<i>67</i>
<i>Extracción fenólica de ADN utilizada en la Universidad de Santiago de Compostela</i>	<i>69</i>
<i>Protocolos de amplificación para STR y Amelogenina</i>	<i>71</i>
<i>Procedimiento resumido de cuantificación de ADN (método de Quantiblot).....</i>	<i>72</i>
<i>ESTADISTICA.....</i>	<i>74</i>

INTRODUCCIÓN

La existencia de polimorfismos genéticos ha demostrado ser muy útil en la identificación de individuos. Estos polimorfismos han impulsado el descubrimiento, desarrollo y estandarización de nuevas técnicas de biología molecular, las cuales han simplificado el trabajo y han aumentado el poder de discriminación entre individuos. Aún así, falta mucho por hacer ya que, se siguen presentando problemas de contaminación y deterioro en cierto tipo de muestras.

La identificación de individuos a nivel genético ha adquirido gran importancia en varios campos, por ejemplo: la antropología solamente trataba de reconstruir las organizaciones sociales del pasado por medio de las escrituras antiguas (jeroglíficos), artefactos y tumbas, encontrados en sitios de excavaciones arqueológicas. También los restos óseos se analizaban morfológicamente con el fin de diferenciar sus géneros y aproximar la edad que tenían los individuos cuando murieron, así como también para apreciar el fenómeno evolutivo entre otras cosas. Hoy día, los restos humanos encontrados se pueden analizar por medio de técnicas que permiten estudiar los ácidos nucleicos presentes en los restos óseos, tanto para identificarlos como para tratar de encontrar las relaciones de parentesco. De esta manera, los restos humanos como tales, han adquirido mayor valor pues se ha enriquecido el conocimiento de las civilizaciones pasadas.

Otro campo importante es el de las ciencias forenses, que trata en conjunto con las autoridades de mantener el orden social entre otras cosas. Instituciones como el Organismo de Investigación Judicial (OIJ) del Poder Judicial de Costa Rica, han hecho un esfuerzo por aclarar los resultados de los estudios de criminología (homicidios, violaciones, negación de paternidades, etc).

En el pasado, se hacían análisis de identificación de individuos basados en los grupos sanguíneos ABO/Rh, cuyo poder discriminatorio era muy pobre. Otro análisis que aún se practica es el de huellas digitales, que sigue siendo muy útil ya que tiene gran poder discriminatorio, inclusive entre gemelos idénticos, sin embargo, no siempre se encuentran bien marcadas o disponibles.

La biología molecular ha aportado basto conocimiento en este campo. Actualmente las nuevas tecnologías basadas en el análisis del ácidos desoxirribonucleicos (ADN) son la base esencial para aclarar la mayoría de los conflictos sociales. El análisis del ADN permite estudiar a fondo las

evidencias presentes en cualquier caso. Con estas técnicas se analizan cabellos, semen, saliva, sangre, tejidos carnosos, huesos, dientes y uñas, comúnmente encontrados en los sitios del suceso.

Para el análisis del ADN, se intenta siempre trabajar con la mejor muestra. Instituciones de investigación forense como el OIJ o el Federal Bureau of Investigation (FBI) cuentan con un plan de trabajo que indica la jerarquía de los tejidos, con el fin de obtener el mejor resultado con el menor número de complicaciones y en el menor tiempo. En general, se busca sangre, luego tejidos carnosos y por último huesos.

En ocasiones, los restos óseos se han presentado como la única muestra presente a la que se le puede practicar un análisis de ADN. Por ejemplo, en la investigación de la paternidad en el que el padre ha fallecido y hay que realizar la investigación a partir de restos óseos exhumados, o bien, cuando se debe hacer la identificación de restos encontrados a la intemperie en zonas de escaso o difícil acceso. Debido a las condiciones en las que se encuentran y a los elementos con los que han interactuado (como lo son animales, la erosión o el simple proceso de descomposición del cuerpo) es muy probable que no exista otro tipo de muestra analizable a nivel molecular, más que huesos.

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 (Fawcett, 1990). 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.

Ahora bien, si se toma en cuenta que todas las células nucleadas presentes en la muestra contienen el mismo ADN, cuyas dimensiones microscópicas podrían haber sobrevivido a la degradación; y que las secuencias necesarias para el análisis de identificación son muy cortas, la probabilidad de encontrar ADN amplificable es mayor. El único obstáculo presente es la cantidad de contaminantes que inhiben la amplificación de las secuencias útiles; es por eso que el método de extracción es la única variable que se puede tratar de controlar con el fin de preservar el material genético de la muestra, para el análisis.

La metodología de trabajo no ha logrado eliminar por completo los contaminantes, que difieren según la muestra, el contexto y la eficiencia de la extracción.

Existen varias casas comerciales que han desarrollado paquetes de extracción que de alguna manera han demostrado ser provechosos como el de “glass milk” (Cattaneo et al, 1997), pero son costosos y no resuelven la problemática por completo.

La necesidad del Laboratorio de ADN de la sección de Bioquímica del Complejo de Ciencias Forenses de optimizar los protocolos, con el fin de obtener un mejor provecho sobre las muestras de material humano degradado, ha promovido esta investigación.

El presente estudio, realizado en el Complejo de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, persigue determinar el método que proporcione las mejores condiciones al material genético durante la extracción, mediante la evaluación de 3 métodos de extracción fenólica de ácidos nucleicos, a partir de restos óseos, donde se tomó en cuenta la cuantificación y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las muestras.

MARCO TEÓRICO

Fundamentos básicos.

El cuerpo humano está compuesto por unos 100 trillones de células, las cuales poseen en su núcleo el ADN con la misma información genética. Esto se debe a que todas se originan de una sola célula, el cigoto (Butler, 2001). El Cigoto es una célula pluripotencial formada por la unión de un óvulo y un espermatozoide, de modo que la mitad del ADN nuclear proviene del padre y la otra mitad, de la madre.

El ADN contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas, este ADN es el llamado expresivo o codificante el cual representa tan solo un 3% del ADN total (Birney et al, 2001). El ADN codificante es el más interesante desde el punto de vista médico y posee en general poca variabilidad entre las personas, con excepción de la región HLA la cual presenta una gran cantidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's).

El ADN es el soporte de toda la información genética, la cual se transmite de generación en generación. Esta información es la que determina nuestras características físicas, así como también otros atributos que en conjunto nos hacen únicos. De esta manera, el ADN refleja quiénes somos (genotípicamente y fenotípicamente), es por eso que se utiliza como huella genética.

La identificación humana por marcadores genéticos se vale de la variación polimórfica que existe entre individuos, debido a la existencia de varias posibilidades (alelos) para cada locus genético.

Cada Marcador busca estas variantes polimórficas dentro de cada par de cromosomas homólogos. Estos cromosomas son del mismo tamaño y contienen la misma distribución de la información; es decir, que una copia de cada gen está ubicada, en la misma posición de cada cromosoma perteneciente a un par homólogo, sin embargo, los segmentos o pequeñas secuencias utilizadas para la identificación humana, se encuentran en las secciones no codificantes del ADN, las cuales se pueden encontrar entre genes, dentro de genes y en secciones que no codifican para variación genética (Butler, 2001).

Desde el punto de vista de la investigación criminal y el establecimiento de relaciones de parentesco en pruebas de paternidad, es mucho más útil el

ADN no codificante. Este no es transcrito a ARN y no contiene información para la producción de proteínas, sin embargo es altamente variable entre individuos y por eso se dice que es muy polimórfico. El ADN no codificante representa la mayor parte del genoma humano (97%). Aproximadamente la mitad del ADN no codificante (46%), está compuesto por secuencias repetidas las cuales aún no se sabe cual es su función. Sin embargo el ADN más utilizado en la genética forense es el repetido en tandem; y dentro de él, el ADN minisatélite y microsatélite. El resto del ADN esta compuesto por secuencias promotoras, secuencias reguladoras de transcripción y otras (Birney et al, 2001).

Si partimos de que “genotipo” es la caracterización de los alelos presentes en un locus genético, que se expresa en términos de homocigota o heterocigota, lo cual es muy útil al tratar de dilucidar cual alelo proviene del cromosoma paterno y cual del materno; el proceso de la amplificación e identificación de estos marcadores genéticos persiguen obtener un “perfil genético”, que consiste en la combinación de varios genotipos obtenidos de múltiples loci², con lo que se podría diferenciar a un individuo del resto y relacionarlo con sus parientes.

Restos óseos como fuente de ADN

En la identificación por ADN de restos óseos se prefiere el fémur y el húmero, debido a que son huesos largos que brindan suficiente material para análisis, especialmente en la identificación de restos de niños. Este tipo de hueso se presenta como un cilindro de pared gruesa hecho de “hueso compacto” y una cavidad central voluminosa, ocupada por médula ósea. Su función es la de envolver a los elementos formadores de la sangre de la misma. También posee características como alta resistencia a la tracción y a la compresión, que hacen que el hueso sea más resistente a la degradación (Fawcett, 1990).

El hueso compacto carece de porosidades visibles a simple vista. De esta manera, las estructuras más externas sirven de protección a las células más internas (como las oosteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), las cuales son de interés en el análisis molecular porque contienen ADN. Además el hueso compacto posee unas estructuras cilíndricas llamadas Sistemas Haversianos u osteonas las cuales tienen una función vascular (donde es posible encontrar células nucleadas), a diferencia del hueso esponjoso (Fawcett, 1990), el cual no se utiliza en el análisis de

² Plural de locus.

ADN ya que, su porosidad permite una mayor degradación y sirve como mejor hospedero a la microbiota de la zona.

El sistema Haversiano es muy importante en la extracción de ADN debido a que la sangre que se encuentre en estos canales aumenta la posibilidad de obtener ADN de la muestra pues no se utiliza la médula.

“La médula ósea ocupa las cavidades cilíndricas de los huesos largos y los intersticios de la esponjosa de los cuerpos vertebrales, las costillas, el esternón y los huesos planos del cráneo y de la pelvis... Es un tejido blando, densamente celular, formado por los precursores de la sangre y por macrófagos, células adiposas, células y fibras reticulares. Las proporciones relativas de estos diferentes tipos celulares sufren cambios con la edad, y varían también en diferentes regiones del esqueleto” (Fawcett, 1990). Al nacer los huesos son muy activos y su médula es de color rojo, pero lentamente con la edad, cambian a un color amarillo por un incremento de células adiposas. “En los adultos, la médula roja persiste sólo en los extremos proximales del húmero y del fémur” (Fawcett, 1990) y en otros huesos más pequeños. Todas estas características, refuerzan la elección del fémur y el húmero para la extracción de ADN. En estos huesos, gracias a su forma compacta, la médula puede ser removida para disminuir los contaminantes adiposos, entre otros.

Aún cuando el hueso es una estructura muy fuerte, su descomposición normalmente ocurre como una pérdida de la estructura integral, donde las células expuestas sufren una degradación importante a nivel molecular.

Se ha observado una destrucción del Sistema Haversiano del hueso compacto (Colson et al, 1996), donde los osteoblastos (sus células vecinas), podrían sufrir una degradación significativa. La destrucción se observa como la creación de túneles que se asumen son de origen microbiano o fúngico.

Existen estudios que indican que la preservación de los huesos no se ve afectada tanto por el tiempo ni el período de exposición, sino por las condiciones inapropiadas características del medio en que se encuentran. Por ejemplo, Colson et al (1996) basa su investigación en la teoría que menciona que los cambios degradativos en los huesos enterrados no se producen de forma gradual, sino que estos cambios ocurren por acción de los microorganismos en las etapas más recientes del entierro. Esta idea sugiere que los huesos enterrados son posiblemente los más degradados.

Según Cattaneo et al (1997), el trabajar con dientes genera menos problemas ya que la cámara pulpar es más limpia, pero no siempre se cuenta con este tipo de muestra y pueden presentarse distorsiones si las piezas

dentales se encuentran enterradas en diferentes condiciones de suelo y de pH.

Un inhibidor de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es el ADN de origen microbiano, debido a que la cantidad de éste presente en la muestra, puede inhibir la hibridación de los primers³ o imprimadores; ya sea por competencia o por baja probabilidad de interacción ADN humano-primer. Para reducir este problema, Colson et al (1996) y Lassen et al (1996) recomiendan irradiar con luz ultravioleta por 5 minutos para inactivar la contaminación en la superficie de la muestra. Sin embargo, esta radiación no elimina el ADN contaminante (microbiano u otro), sino que altera la estructura de los ácidos nucleicos mediante la formación de enlaces covalentes entre dos pirimidinas adyacentes que resultan en dímeros de pirimidinas (timinas o citocinas) (Alberts et al, 1994), lo que podría imposibilitar la hibridación con un primer o la acción de la polimerasa. Esto no es muy seguro, ya que la radiación incluye a los ácidos nucleicos de la muestra de interés, en alguna medida disminuye la posibilidad de extraer ADN amplificable.

En el laboratorio de Bioquímica del OIJ lo que se hace es una limpieza exhaustiva, la cual consiste en remover una capa delgada de la superficie del hueso; de esta manera se elimina gran parte del ADN contaminante sin alterar el ADN de la muestra.

Obtención de ácidos nucleicos

En el proceso de recuperación de ADN, cada paso es vital. Las muestras deben ser manejadas apropiadamente desde las etapas iniciales de la investigación. La recolección de las muestras es muy importante ya que se puede contaminar con ADN extraño. De igual manera, las muestras se preservan mejor si se almacenan secas, en condiciones de frío (-70°C preferiblemente) para reducir la tasa de crecimiento bacteriano y la degradación. Los extractos ya realizados, se deben mantener a -20°C o preferiblemente a -80°C para prevenir la acción de nucleasas⁴.

El tipo de extracción de ADN también afecta la calidad y la cantidad de ADN. Existen varios métodos de extracción de ácidos nucleicos, como por ejemplo:

³ Son pequeñas secuencias específicas de oligonucleótidos que son utilizados en la PCR.

⁴ Enzimas cuya función es la de degradar el ADN para reciclar los componentes de los nucleótidos.

- La extracción con Chelex que es simple, rápida y menos costosa que otros métodos, extrae ADN de cadena simple, pero es muy poco eficiente en huesos. El Chelex es un inhibidor de la PCR.
- Las técnicas con sílica son muy prometedoras pero las columnas son costosas.
- Las técnicas fenólicas son las más utilizadas en la recuperación de ADN a partir de restos óseos, sin embargo los reactivos que se utilizan son peligrosos y hay que manejarlos con cuidado.

La extracción fenólica, es una extracción orgánica. Requiere básicamente de la adición de químicos como SDS (sodium dodecyl sulfate) y proteinasa K para lisar las células y remover las proteínas que protegen al ADN, como las histonas, cuya función es empacar al ADN para que adquiera la forma de cromosoma; una mezcla de fenol-cloroformo se utiliza para separar las proteínas del ADN. Las proteínas quedan en la fase orgánica de la solución fenol-cloroformo, mientras que el ADN se encuentra en la fase acuosa.

Cuantificación de ácidos nucleicos.

Una vez extraído el ADN, una forma de estimar la cantidad presente en el extracto, es mediante la cuantificación. Según el método que se utilice, se puede apreciar la cantidad de ácidos nucleicos totales, proteínas presentes, pureza del extracto, ADN humano solamente, etc.

El determinar cuanto ADN hay y su pureza en un extracto, es muy importante en muchos de los ensayos basados en PCR. Por ejemplo, existen ensayos que resultan mejor si la concentración de ADN es baja. En casos donde hay mucho ADN, podría inhibirse la PCR o los resultados podrían presentar picos que se salen de la escala los cuales imposibilitan el análisis. Este tipo de contratiempos se pueden evitar al hacer diluciones de extracto luego de la cuantificación. Por el contrario, donde hay muy poco ADN se pueden presentar falsos negativos por una falla en la amplificación (Butler, 2001); se puede tratar de corregir si se sabe que hay poco ADN al agregar mayor cantidad de muestra a la reacción de PCR.

Cuantificación Espectrofotométrica

Una característica del ADN es la de presentar un pico de absorción en presencia de radiación a 260nm. Este pico de absorción se debe a la presencia de las bases púricas y pirimídicas. El ADN bicatenario presenta una absorción menor que el monocatenario, debido a que el emparejamiento de las bases (por enlaces de puentes de hidrógeno) reduce la absorción de la luz ultravioleta (figura 1) (Madigan et al 1998). Esta particularidad es aprovechable en la cuantificación de ADN; sin embargo, así como encontramos ADN en la muestra, también se encuentran contaminantes tales como proteínas o fenol residual que pueden incurrir en un falso positivo. Es decir, la absorbancia a 260nm no es específica para ADN.

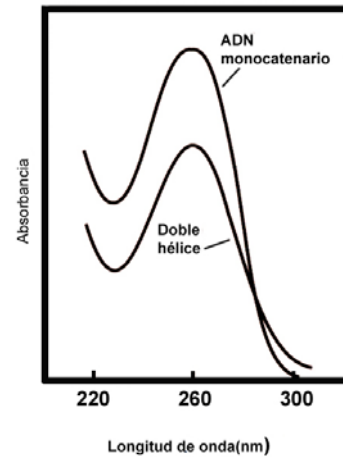


Figura 1 Absorbancia del ADN monocatenario y

La cuantificación espectrofotométrica también permite estimar la cantidad de ARN presente en un extracto. La absorbancia del ARN se puede analizar en términos de proporciones, lo que genera información útil de pureza. Por ejemplo, si la proporción entre la absorbancia de ARN a 260nm y 280nm es menor a 1.75, el extracto contiene contaminantes de tipo proteínico, y si la proporción entre la absorbancia a 260nm y 230nm es menor a 2.0, existe contaminación por carbohidratos en el extracto (Miesfeld, 1999).

Cuantificación por Hibridación con una sonda

Existen otros tipos de cuantificación, por ejemplo, los que implican la afinidad de una sonda. Este tipo de técnica se puede obtener en diferentes presentaciones según la casa comercial y el objetivo que se persigue. Por ejemplo la cuantificación por Slot blot más conocida en el mercado es el Quantiblot (figura 2).

La cuantificación por Slot Blot es tal vez el método más utilizado en el ámbito forense (Butler, 2001). Su objetivo específico es el medir la cantidad de "ADN humano", por comparación con un patrón. La técnica consiste en la

⁵ La proporción debe estar entre 1.7 y 2.1

hibridación de una sonda específica de 40 pb (pares de bases) complementaria a la secuencia D17Z1, localizada en el cromosoma 17.

Este ensayo requiere de varias horas, pero es muy certero ya que puede detectar ADN humano de cadena simple y doble. Además permite la cuantificación de varias muestras al mismo tiempo.



Figura 2 Membrana de cuantificación (Quantiblot)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una estrategia de amplificación de ADN que fue desarrollada en los años 80. El PCR fue acreditado a Kary Mullis, un científico que investigaba para CETUS, una compañía de Biotecnología ubicada en California. Mullis recibió un premio Nobel en Química en 1993 al demostrar, junto con otros cinco científicos, que se podía amplificar secuencias específicas de ADN con el uso de oligonucleótidos como primers (Miesfeld, 1999).

La PCR se basa en la bioquímica de los ácidos nucleicos. La reacción de amplificación requiere de la adición de: primers específicos a la secuencia de interés, ADN polimerasa termoestable (normalmente se usa Taq polimerasa), deoxynucleosidos trifosfatados (dNTP's) y el ADN de la muestra que se desea analizar. Esta mezcla de compuestos se somete a una serie de cambios de temperatura, los cuales se repiten cíclicamente con el fin de duplicar la cantidad de segmentos amplificados (amplicones) existentes en el ciclo anterior. Se hacen normalmente de 20 a 35 ciclos.

Cada ciclo consta de un breve calentamiento inicial a 95 °C para desnaturalizar el ADN bicatenario y obtener cadenas simples. Luego se enfría entre 50 ° y 65 °C para que los primers logren hibridarse a las secuencias complementarias del ADN. A esta temperatura se le llama "temperatura de anillamiento". Los complejos primer-ADN se incuban a 72 °C (temperatura de extensión) para que la ADN polimerasa pueda sintetizar el nuevo segmento de ADN usando los dNTP's (Alberts et al, 1994). Una vez completados los ciclos, se deja la muestra a 4 °C para inhibir cualquier reacción.

El proceso de PCR se realiza en un termociclador (figura 3), este es el aparato utilizado para hacer los cambios de temperatura con la mayor precisión posible en el tiempo óptimo. El termociclador se ha convertido en una herramienta básica de trabajo, de cualquier laboratorio de Biología Molecular.



Figura 3 Termociclador 9700

Secuencias cortas repetidas en tandem (STR's)

Antecedentes

El descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN en el genoma humano, por Wyman y White en 1980, hizo posible el reconocimiento del potencial del ADN en la producción de perfiles genéticos útiles para identificar individuos o indicios biológicos de cualquier índole.

En 1985 surgieron los denominados “minisatélites”, con el descubrimiento hecho por Alec Jeffreys y sus colaboradores (1985), de una secuencia de 33pb inmersa en el gen de la mioglobina humana, esta secuencia se encontró repetida 4 veces consecutivas (en tandem). Kusuke Nakamura y colaboradores (1987), denominan a estos minisatélites VNTR's (variable number of tandem repeats). En 1988 Craig y sus colaboradores llamaron STR's (short tandem repeats) a los casos donde la secuencia repetida era un di, tri o tetranucleótido.

El análisis de RFLP's (polimorfismos en los tamaños de los fragmentos de restricción) fue el primer método utilizado para identificación por ADN. Este análisis comprende el uso de enzimas de restricción⁶, para digerir el ADN en secciones específicas cercanas a un marcador genético VNTR. Los resultados de la digestión se podían observar por la hibridación de una sonda, luego de haber hecho una transferencia de Southern⁷.

Inicialmente se utilizaron sondas multilocus en análisis de paternidad y otros por características como el suministrar gran cantidad de información, estabilidad somática y herencia mendeliana. Sin embargo, presentaba desventajas tales como que la información que generaba consideraba solamente el fenotipo del espécimen más que el genotipo, de esta manera, los cálculos de probabilidad no se basaban en las frecuencias alélicas poblacionales ya que, los loci no eran definidos.

Luego, las sondas unilocus mostraron la presencia de información genotípica, de modo que, los cálculos se basaban en las frecuencias alélicas de las poblaciones. También detectaban un único segmento de ADN, el cual brindaba patrones de una o dos bandas (según si el espécimen era homocigota o heterocigota para ese locus). De esta manera, los resultados eran más claros y hasta se lograba ver si había contaminación con otro ADN (mezclas). Todo esto era ventajoso sobre las sondas multilocus, sin

⁶ “tijeras moleculares” nucleasa capaz de cortar el ADN en un sitio específico.

⁷ Técnica donde los fragmentos de ADN son separados por electroforesis y luego son inmovilizados en una membrana para detectar la presencia de moléculas específicas por medio de una sonda.

embargo, ambos tipos de sondas requerían de ADN bien conservado y al menos 50 ng del mismo por sonda.

En general, los RFLP's presentaban limitaciones en cuanto a la calidad y cantidad de ADN requerido. Además el tiempo de detección era muy largo (semanas) y las sondas debían ser radioactivas o inmunológicas.

El uso de la PCR revolucionó los análisis de identificación; se utilizó otro tipo de elementos repetitivos (mini y microsátélites). La sensibilidad y rapidez de la PCR estaba menos limitada por la calidad y cantidad de ADN recuperado, lo que era ventajoso.

Inicialmente se amplificaron los VNTR's (secuencias de unos 400 a 2300 pb), pero en las aplicaciones forenses no era tan útil, ya que las muestras de tipo forense, frecuentemente se encuentran degradadas.

Los microsátélites o STR's eran más útiles, porque las secuencias medían entre 100 y 350 pb lo que aumentaba la probabilidad de encontrarlos conservados.

Los marcadores STR han adquirido mucha popularidad en la labor de identificación genética forense, básicamente porque se fundamentan en la técnica de PCR y además, porque permiten trabajar con muestras degradadas o con poco ADN.

Los STR son pequeñas secuencias repetidas (de 3 a 7 pares de bases) de longitud. Estas secuencias están distribuidas en todo el genoma humano y son una fuente rica en marcadores polimórficos, sin embargo los más utilizados en genética forense son las repeticiones de 4 pb o tetranucleótidos (Mireya, 1999).

Las secuencias amplificables STR, representan a los alelos de cada par de cromosomas. Los alelos son diferenciados unos de otros por el número de copias de la secuencia repetida, inmersas en la región amplificada. Esta diferenciación se hace por medio de una separación electroforética.

Algunas de las ventajas de uso de STR son:

- La metodología es rápida.
- La técnica se basa en PCR.
- Es un método no radioactivo.
- Esta evalúa cantidades muy pequeñas de ADN.

- Es más tolerante al ADN degradado que otros sistemas, porque los productos amplificados son menores a 400 pb de longitud. (menor a los VNTR's).
- Es un formato que permite el uso de una variedad de técnicas rápidas de purificación de ADN.
- Contiene alelos de longitudes discretas y separables, lo que permite la construcción de escaleras alélicas.
- Permite la automatización, al utilizar métodos de detección sensibles a la fluorescencia.

Los marcadores incluidos en los paquetes de STR, poseen la ventaja de ser seleccionados cuidadosamente para minimizar artefactos llamados "alelos microvariantes". También fenómenos como "plus A" que se debe a la adición de una adenina al final de la extensión de la secuencia de interés. Este fenómeno no es problemático si se estandarizan todas las secuencias de amplificación, al agregar una etapa final al termociclador de 30 minutos a 60°C. Sin embargo, se ha reportado la ocurrencia de otro tipo de fenómenos como: "n-4 bands" (visto en el gel como ecos), "stutter"⁸ (Rojas, 1995) y "shadow bands", que son anomalías que ocurren debido a la pérdida de una repetición durante la amplificación. También se ha reportado cierto ruido, el cual depende básicamente del locus y la secuencia de ADN a amplificar⁹.

Amelogenina

La amelogenina es un gen que codifica para ciertas proteínas encontradas en el esmalte de los dientes. Su amplificación por PCR produce secuencias de 106 pb que provienen del cromosoma X y secuencias de 112 pb del cromosoma Y (Butler, 2001). El ensayo de amelogenina se utiliza para determinar si la muestra es originada de un hombre o una mujer. La amelogenina no pertenece a los STR's, sin embargo esta basada en la técnica de PCR.

La utilización de este primer tiene la ventaja de ser muy sensible y de servir de control positivo, pues el cromosoma X se encuentra en ambos sexos.

⁸ Tartamudeo de la polimerasa, producido por la formación de un bucle entre el ADN de interés y el primer por malos apareamientos a la hora de la síntesis del ADN por disociación; resulta como la pérdida de repeticiones completas.

⁹ Información obtenida del Manual Técnico de PROMEGA, GenePrint™ STR.

Electroforesis

La electroforesis de ácidos nucleicos consiste en la separación de moléculas que difieren en longitud. Esta separación se logra al hacer migrar a los ácidos nucleicos, los cuales están negativamente cargados, en un campo eléctrico uniformemente cargado a través de una matriz sólida. La migración ocurre del cátodo al ánodo del sistema eléctrico en la cámara de electroforesis (figura 4).

La electroforesis es el proceso utilizado para analizar los fragmentos amplificados en PCR, también se puede analizar otros tipos de moléculas como por ejemplo, proteínas.

Cuando se trabaja con fragmentos menores a 500 nucleótidos de longitud, se utiliza una matriz especialmente diseñada de poliacrilamida desnaturalizante, la cual permite separar las moléculas de ácidos nucleicos que difieren hasta en un nucleótido (Alberts et al, 1994) lo que también permite la secuenciación de los fragmentos.

Existe otro tipo de electroforesis, la electroforesis capilar, la cual es mucho más sensible y rápida. Esta permite no sólo la separación de las moléculas, sino también la secuenciación de los segmentos amplificados de ADN, sin embargo, es equipo muy costoso.



Figura 4 Equipo básico de electroforesis

MATERIALES Y METODOS

Selección de muestras

Se seleccionaron seis huesos de diferentes individuos del banco de muestras congeladas a -20 °C, del Laboratorio de Bioquímica del Complejo Ciencias Forenses del O.I.J.¹⁰. Cinco fémur (cuatro masculinos y uno femenino) y un cráneo femenino.

Se investigó en el archivo de patología del O.I.J. la procedencia de cada una de las muestras para llevar un registro del contexto en el que se encontraban las mismas antes de ingresar al Laboratorio de Bioquímica. Las muestras fueron clasificadas como: contexto “exhumado” (para huesos enterrados), “acuático” (para huesos encontrados en ríos y represas) y “otros” (para los huesos expuestos sobre una superficie o diferentes a los contextos anteriores) (tabla resumen, anexo).

Las muestras se manejaron con un código de tres dígitos, por ejemplo “AF1”. El primer dígito se refiere a la muestra: AF1 (A, B, C, D, E o F). El segundo dígito hace referencia al tipo de extracción: AF1 (F = FBI; O = OIJ; S = Santiago de Compostela). El tercer dígito, se refiere al número de repetición por muestra: AF1 (1, 2 o 3).

Extracción de ADN

Pulverización de muestras

Por ser muestras ya analizadas, no se necesitó limpiarlos de residuos carnosos o impurezas en su exterior (figura 5). Cada hueso se trabajó por separado, en una pequeña cámara de plástico transparente, siempre tratando de mantener la asepsia.



Figura 5 Limpieza exterior de un fémur

¹⁰ La selección de los huesos se basó en su disponibilidad. Las muestras habían sido procesadas anteriormente.

Muestras tipo fémur:

Se removió la médula con un taladro especial (Dremel) (figura 6). Con una sierra vibratoria de morgue, se cortaron aproximadamente 20 discos de hueso (con forma de dona), del centro de cada fémur, que luego se colocaron en una placa de petri estéril.



Figura 6 Remoción de la médula del fémur

Los discos obtenidos presentaban un diámetro de unos 2.5 cm por 0.3 cm de grosor, pero la variación de estas medidas depende básicamente de la edad y el fenotipo de la muestra; la cantidad de discos estuvo sujeta a obtener al menos 20 gramos de muestra, ya que los análisis se requerían por triplicado para obtener resultados significativos y reproducibilidad. También se requería de una cantidad suficiente de extracto para hacer todas las cuantificaciones pertinentes (figura 7).



Figura 7 Discos cortados de la parte central del fémur

El cráneo fue cortado con la misma sierra, debidamente limpia. Se obtuvo varios fragmentos de unos 3 cm de largo y 1 cm de ancho.

Todas las muestras, trabajadas individualmente, se cortaron con una cizalla plana ¹¹, para obtener fragmentos lo suficientemente pequeños para pulverizarlos en el Freezer/Mill¹² (figura 8).

Una vez obtenidos los trozos de hueso, se introdujeron en viales (tipo Falcon) de 50 ml debidamente rotulados con el número de muestra y se almacenaron a -20 °C, sin pulverizar.



Figura 8 Freezer/Mill

Los viales utilizados para pulverizar las muestras en el Freezer/Mill fueron previamente irradiados con luz ultravioleta o autoclavados. Se ajustó el Freezer/Mill a 15 minutos de pre-enfriamiento con Nitrógeno líquido y tres ciclos de pulverizado a 14 golpes por segundo durante 2 minutos. Cada ciclo de pulverizado estuvo intercalado por dos minutos de enfriamiento de la muestra. Cada muestra se pulverizó por separado.

¹¹ Tijera normalmente utilizada para cortar metal.

¹² El Freezer/Mill es un aparato utilizado para pulverizar muestras congeladas previamente con nitrógeno líquido.

Extracción

Se utilizaron 9 viales (tipo Falcon) de 50 ml, por muestra, se repartieron dos gramos de polvo de hueso en cada vial debidamente rotulado. Se realizó la extracción de ADN de cada una de las repeticiones por muestra de la siguiente forma: tres viales por muestra se destinaron al método de extracción utilizada de rutina por el Laboratorio de ADN del OIJ, otros tres al método usado por el Laboratorio de la Universidad de Santiago de Compostela y los tres restantes al método utilizado en el FBI.

Se debe tener claro que los métodos de extracción fueron ligeramente modificados para adaptarlos a las condiciones y materiales de trabajo disponibles en el Laboratorio de Bioquímica del OIJ. Esta modificación pudo haber influido de alguna manera en el desempeño de los métodos (anexo).

Método	U. SdC	O.I.J	F.B.I.
Pulverizado de las muestras en el freezer/mill			
Buffer de extracción por reacción	DTT 1M 4ml EDTA 0,5M pH8 160µl SDS 10% 280µl Proteinasa K [10mg/ml] 200µl	High TE 7.5 ml Buffer Lisis 7.5 ml Proteinasa K [10mg/ml] 750µl	SEB 6ml Proteinasa K [10mg/ml] 2400µl
Incubación con agitación	56° C por 2 h. 50µl más de P. K. 56° C de 16 a 24h	55° C de 24 a 72h	56° C de 2 a 24h.
Centrifugar y recuperar el sobrenadante (*)			
Desproteínización	PCIA 25:24:1*	Fenol* PCIA 25:24:1* CIA 24:1*	PCIA 25:24:1*
Recuperación de ADN	Precipitación de los ANT en presencia de Acetato de Sodio y Etanol.		

Cuadro 1 Resumen comparativo de los métodos de extracción fenólica utilizados en esta investigación.

Cuantificación de Ácidos Nucleicos

Una vez obtenidos los extractos de ADN, se cuantificaron por tres métodos diferentes para estimar la cantidad de ADN presente. Se utilizó el fluorómetro Hoefer® DyNA Quant® 200, el Quantiblot (método de cuantificación por hibridación de una sonda específica) de PERKIN ELMER y el kit DNA DipStick (Invitrogen).

Los resultados obtenidos de cada método se tabularon en una base de datos para su posterior análisis.

Amplificación (montaje de PCR)

Se montaron los ensayos de STR y Amelogenina en la cámara de montaje de PCR. Se utilizaron cuatro diluciones 1:1, 1:2, 1:10 y 1:100, por extracto para los ensayos de STR. Los paquetes de amplificación de STR utilizados fueron: “Silver STR™ III triplex” (incluye los marcadores D16S539, D7S820 y D13S317) y STR Multiplex (incluye los marcadores D16S539, D7S820, D13S317 y D5S818) de Promega.

La Amelogenina se montó con la mejor dilución por repetición, la cual se determinó luego del análisis de STR. (anexo).

Electroforesis en Poliacrilamida con Tinción de Plata

Los productos de amplificación se separaron en geles de poliacrilamida al 4%. Las corridas de electroforesis se hicieron aproximadamente a 100 watts, 1850 voltios y 54 mili amperios, por 1 hora y 30 minutos.

Para observar los resultados se tiñeron los geles con una solución de plata.

Búsqueda de Inhibidores de PCR

En aquellas reacciones donde no se obtuvo resultados de amplificación, se realizó un ensayo cruzado muestra-ADN control, para buscar inhibidores de PCR. Se utilizó el paquete STR III para la amplificación de PCR, el cual provee el ADN control K562. Se agregó 2,5 µl del ADN control y 3 µl de la muestra.

Además se cuantificaron las muestras en el GeneQuant, para aproximar la pureza de los extractos y cuantificar la cantidad de proteínas presentes.

Análisis de las muestras

Todos los ensayos de amplificación y de cuantificación generaron resultados, los cuales fueron tabulados para ser analizados estadísticamente.

Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) a los datos que presentaron una distribución normal. Los datos que no presentaron esta distribución, fueron analizados por el Análisis de la Varianza de una vía de Kruskal – Wallis.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la cuantificación de cada una de las repeticiones por muestra se aprecian en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados obtenidos de la cuantificación de ácidos nucleicos por medio de tres métodos diferentes, de extractos de hueso. Laboratorio de Bioquímica del Complejo de Ciencias Forenses del OIJ, 2001

Muestra ↓	Método ↓	FBI			OIJ			SdC		
		F1	F2	F3	O1	O2	O3	S1	S2	S3
A	Q2	18	26	20	30	25	35	10	11	10
	S	50.0	50.0	50.0	10	5	0.5	5	50	50.0
	C	0.312	0.312	0.312	1.25	0.625	5	1.25	1.25	1.25
B	Q2	8	8	5	8	10	5	3	30	2
	S	1	0,1	1	50	50.0	50	50	5	10
	C	0.312	1.25	0.312	1.25	1.25	1.25	1.25	0.312	0.625
C	Q2	0	0	3	5	6	7	20	6	9
	S	0.5	5.0	5.0	500	-	500	5	10	5
	C	1.25	-	-	1.25	0.625	0.625	-	-	-
D	Q2	9	5	4	3	16	15	0	1	25
	S	1	10	10	10	50	500	10	1	5
	C	1.25	1.25	1.25	1.25	-	-	0.625	-	-
E	Q2	4	1	1	7	24	13	2	10	8
	S	5	5	5	5	50	-	0.5	0.5	0.5
	C	-	-	0.625	1.25	0.625	0.625	-	-	-
F	Q2	42	5	28	258	204	107	15	20	7
	S	10	1	10	50	50	-	1	1	1
	C	10	2.5	5	10	10	10	5	5	5

Q2 = Método de cuantificación de DyNA Quant 200, expresado en [ng/μl].

S = Kit de cuantificación DNA Strips, expresado en [μg/μl].

C = Método de cuantificación de ADN humano (Quantiblot), expresado en [ng/μl].

“-“ = El método de cuantificación no arrojó valores.

SdC = Santiago de Compostela.

El método de Santiago de Compostela produjo una contaminación en los extractos, visible en el microscopio (figura 9).

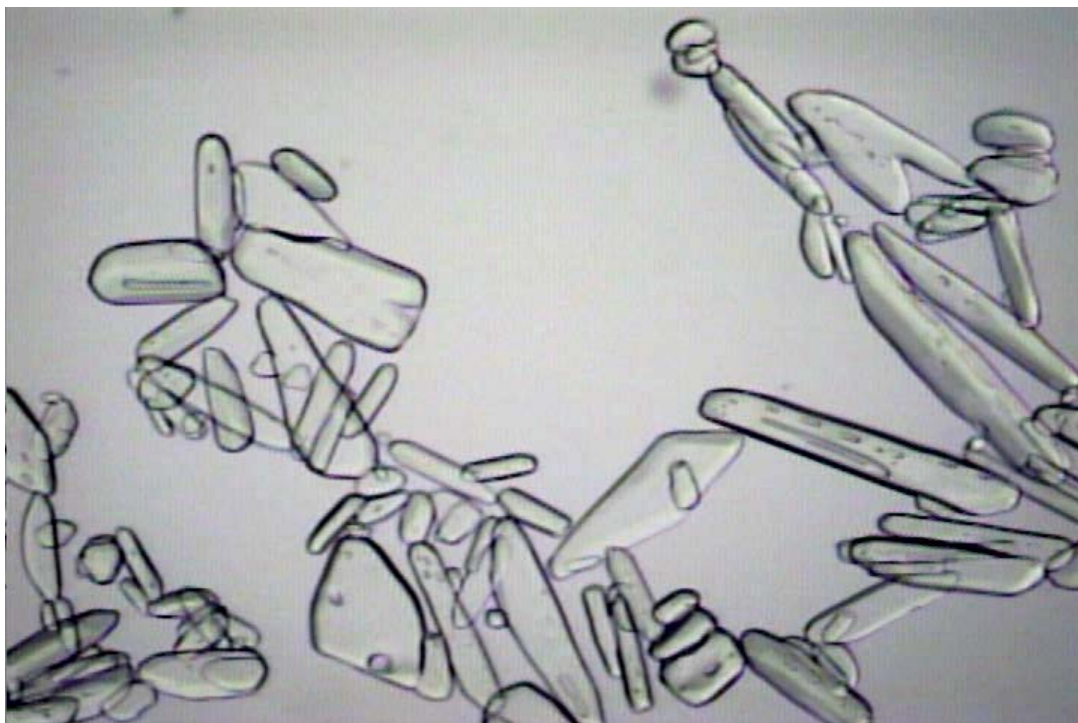


Figura 9 Cristales observados en un microscopio de Luz transmitida a 40X, de las muestras extraídas por el método de Santiago de Compostela

La amplificación de los STR, Amelogenina e inhibidores de amplificación generaron los siguientes resultados luego de haber corrido una electroforesis a los productos amplificados (tabla 2). Las figuras 10 , 11 y 12 son ejemplo de amplificación de STR, Amelogenina e inhibidores de PCR respectivamente.

Tabla 2. Resultados de la amplificación de muestras en el termociclador GeneAmp 9700 del Laboratorio de Bioquímica del Complejo de Ciencias Forenses del OIJ.

Muestras	STR	Amelogenina	Inhibidores de PCR	Muestras	STR	Amelogenina	Inhibidores de PCR
AF1	1	1	0	DF1	0	0	0
AF2	1	1	0	DF2	0	1	0
AF3	1	1	0	DF3	0	1	0
AO1	0	0	0	DO1	0	0	0
AO2	0	0	1	DO2	0	0	0
AO3	0	0	0	DO3	0	0	0
AS1	0	0	1	DS1	0	0	1
AS2	0	0	1	DS2	0	0	1
AS3	0	0	1	DS3	0	0	1
BF1	0	0	0	EF1	1	1	0
BF2	0	0	0	EF2	1	1	0
BF3	0	1	0	EF3	1	1	0
BO1	0	0	0	EO1	1	1	0
BO2	1	1	0	EO2	1	1	0
BO3	1	1	0	EO3	1	1	0
BS1	0	1	1	ES1	1	1	0
BS2	0	0	1	ES2	1	1	0
BS3	0	1	0	ES3	1	1	0
CF1	0	0	0	FF1	1	1	0
CF2	0	0	0	FF2	1	1	0
CF3	0	1	0	FF3	1	1	0
CO1	0	0	0	FO1	1	1	0
CO2	0	0	1	FO2	1	1	0
CO3	0	0	0	FO3	1	1	0
CS1	0	0	1	FS1	1	1	0
CS2	0	0	1	FS2	1	1	0
CS3	0	0	1	FS3	1	1	0

STR / Amelogenina: 1 = resultado positivo de amplificación, 0 = resultado negativo de amplificación.
Inhibidores de PCR: 0 = ausencia de inhibidores de amplificación, 1 = presencia de inhibidores de amplificación.



Figura 10 Ejemplo de un gel de poliacrilamida. Corrida de STR para la muestra AF1. Se muestran las diferentes diluciones realizadas.

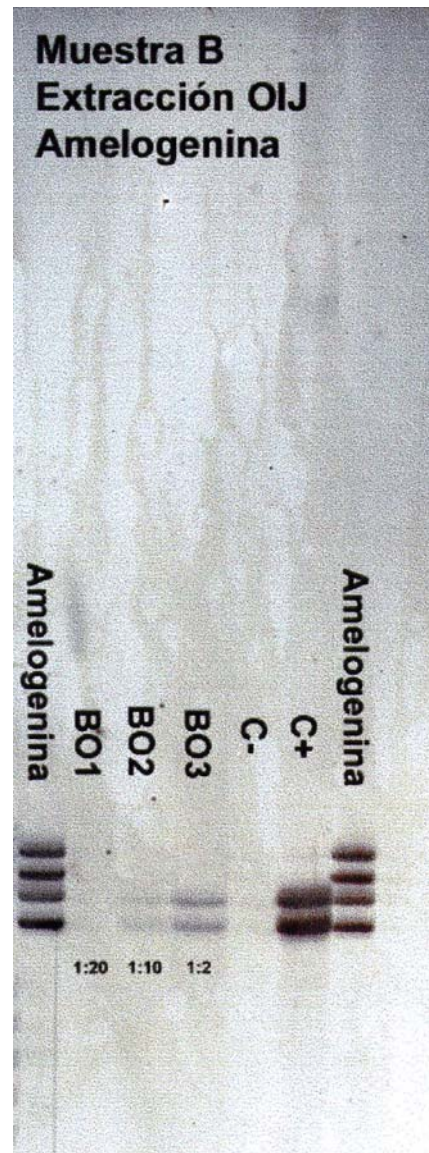


Figura 11 Corrida de Amelogenina para las tres repeticiones de la muestra B, extraídas por el método del OIJ

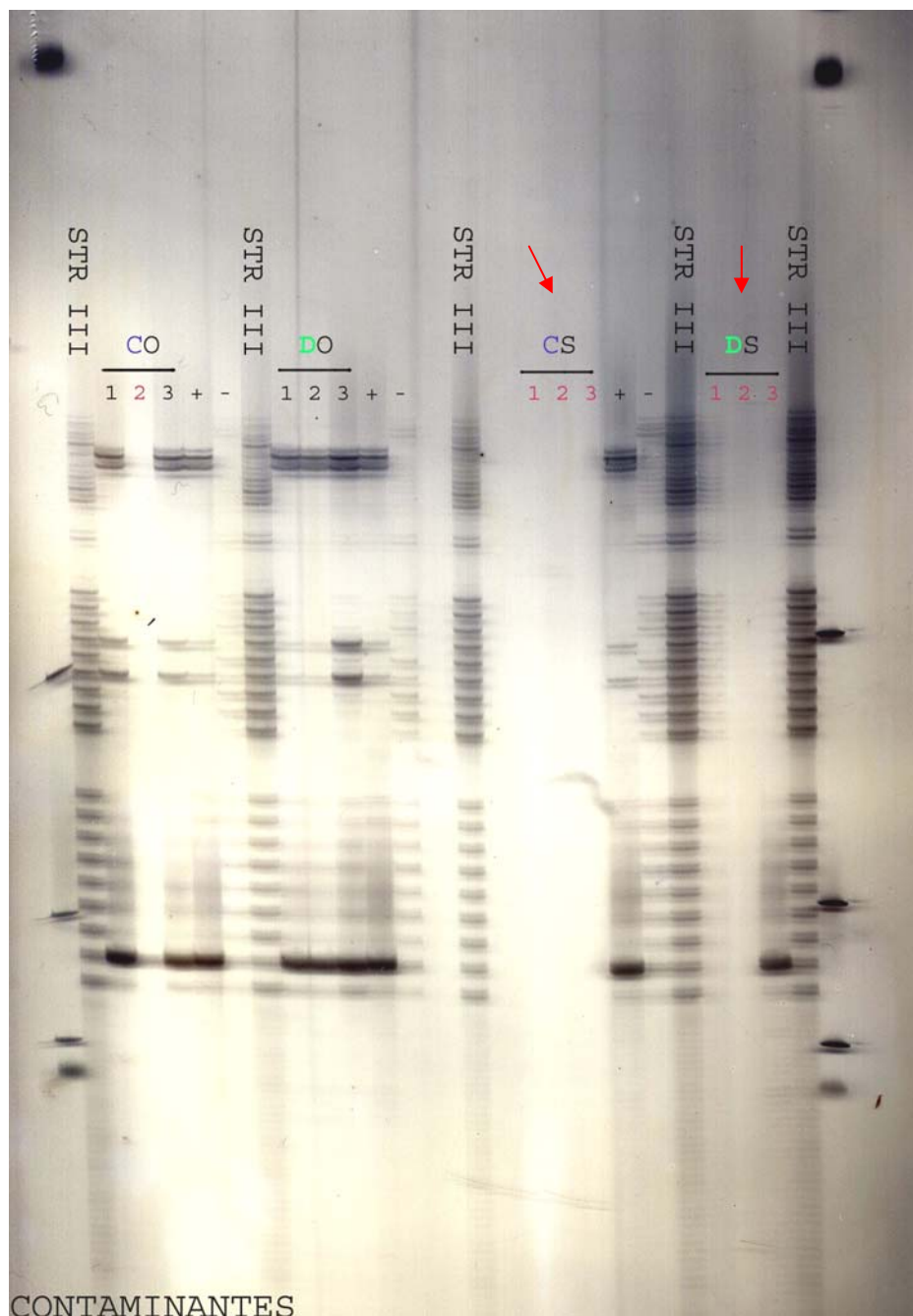


Figura 7 Corrida de inhibidores de PCR para la muestra C y D. La corrida de las repeticiones que se muestran de color rojo muestra la inhibición de amplificación del ADN control K562, por la presencia de inhibidores en las muestras.

Los resultados obtenidos al cuantificar las muestras en el GeneQuant, son los siguientes:

Tabla 3. Resultados de la cuantificación de diferentes variables por medio del GeneQuant. Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2002.

Muestras	Pureza (A260/A280)	Proteínas mg/ml	ARN µg/µl	230 nm	260 nm	280 nm	320nm	Ratio (A260/A280)
AO1	74%	0.1	0.011	0.008	0.001	-0.003	-0.013	1.340
AO2	64%	0.1	0.010	0.010	-0.003	-0.005	-0.015	1.165
AO3	100%	0.0	0.009	0.022	0.004	-0.001	-0.007	1.908
AS1	76%	0.3	0.037	0.151	0.036	0.023	-0.011	1.368
AS2	86%	0.0	0.008	0.024	0.014	0.010	0.004	1.559
AS3	70%	0.0	0.003	0.014	0.009	0.009	0.005	1.267
BF1	86%	0.0	0.004	0.036	0.030	0.028	0.025	1.549
BF2	76%	0.0	0.000	0.028	0.032	0.036	0.047	1.378
BF3	100%	0.0	0.011	0.080	0.054	0.047	0.040	2.205
BO1	77%	0.1	0.011	0.009	0.000	-0.004	-0.014	1.393
BO2	96%	0.2	0.046	0.109	0.079	0.055	0.021	1.735
BO3	96%	0.0	0.014	0.044	0.031	0.023	0.013	1.731
BS1	64%	0.0	0.000	0.046	0.074	0.047	0.051	1.159
BS2	75%	0.0	0.000	0.043	0.039	0.041	0.044	1.358
BS3	39%	0.0	0.001	0.034	0.025	0.026	0.025	0.714
CF1	87%	0.1	0.022	0.249	0.094	0.084	0.066	1.583
CF2	73%	0.4	0.043	0.412	0.090	0.077	0.036	1.322
CF3	82%	0.1	0.019	0.006	0.150	0.030	0.022	1.490
CO1	88%	0.0	0.008	0.060	0.010	0.006	0.000	1.587
CO2	82%	0.2	0.023	0.127	0.022	0.013	-0.006	1.490
CO3	75%	0.0	0.004	0.011	0.004	0.003	0.000	1.353
CS1	100%	0.0	0.004	0.039	0.033	0.031	0.028	2.011
CS2	100%	0.0	0.004	0.056	0.046	0.043	0.041	1.900
CS3	34%	0.0	0.000	0.051	0.042	0.041	0.043	0.621
DF1	82%	0.1	0.009	0.012	0.001	-0.003	-0.011	1.484
DF2	76%	0.0	0.004	-0.001	-0.004	-0.005	-0.009	1.375
DF3	81%	0.1	0.009	0.007	-0.001	-0.005	-0.012	1.462
DO1	72%	0.1	0.014	0.062	0.015	0.011	-0.002	1.300
DO2	75%	0.1	0.012	0.073	0.026	0.022	0.011	1.357
DO3	96%	0.1	0.024	0.134	0.082	0.069	0.052	1.737
DS1	74%	0.1	0.012	0.027	0.007	0.003	-0.008	1.345
DS2	74%	0.1	0.010	0.003	-0.002	-0.005	-0.014	1.334
DS3	71%	0.2	0.022	0.098	0.054	0.048	0.026	1.285
EF1	64%	5.1	0.350	0.288	0.437	0.038	-0.001	1.158
EF2	64%	2.1	0.150	0.196	0.251	0.224	0.064	1.167
EF3	65%	2.0	0.141	0.156	0.196	0.170	0.021	1.175
EO1	100%	0.2	0.070	0.039	0.094	0.043	0.028	1.822
EO2	60%	0.0	0.002	-0.011	0.004	0.004	0.002	1.094
EO3	100%	0.0	0.009	0.056	0.026	0.031	0.040	1.983
ES1	73%	0.0	0.000	0.057	0.056	0.058	0.063	1.327
ES2	74%	0.0	0.000	0.032	0.021	0.022	0.022	1.348
ES3	100%	0.0	0.000	0.066	0.061	0.062	0.067	3.860
FF1	79%	0.2	0.020	0.057	0.067	0.060	0.043	1.428
FF2	71%	3.9	0.349	0.282	0.441	0.344	0.005	1.286
FF3	100%	0.0	0.000	0.035	0.033	0.034	0.034	3.443
FO1	98%	1.9	0.641	0.478	0.870	0.521	0.068	1.771
FO2	99%	1.9	0.700	0.392	0.884	0.499	0.009	1.786
FO3	97%	2.6	0.809	0.563	0.990	0.558	-0.002	1.749
FS1	98%	0	0.015	0.098	0.083	0.074	0.063	1.775
FS2	100%	0	0.007	0.062	0.052	0.046	0.044	3.579
FS3	68%	0	0.002	0.04	0.037	0.037	0.034	1.224

No se realizó la cuantificación de la muestra AF

DISCUSION

Como se ha demostrado en estudios anteriores, los métodos de extracción de ADN no son satisfactorios cuando las muestras están degradadas. Las muestras forenses normalmente son de este tipo, de manera que se dificultan los análisis moleculares, especialmente en huesos. El valorar la eficiencia de los métodos de extracción de ADN es parte del motivo de esta investigación, con el fin de lograr el mayor provecho de las muestras.

La comparación entre los tres métodos de extracción fenólica requirió del análisis de variables que permitan ilustrar el desarrollo de los métodos. La obtención de ADN amplificable en PCR es el objetivo principal de este estudio, el cual necesitó de análisis estadísticos que permitieran explicar las diferencias entre los resultados, ya que estos métodos son muy similares (extracción orgánica).

Se debe tener claro que los métodos de extracción fueron ligeramente modificados para adaptarlos a las condiciones y materiales de trabajo disponibles en el Laboratorio de Bioquímica del OIJ. Esta modificación pudo haber influido de alguna manera en el desempeño de los métodos.

Análisis de cuantificación entre los métodos.

[Análisis de los métodos de extracción según las diferentes cuantificaciones de ácidos nucleicos.](#)

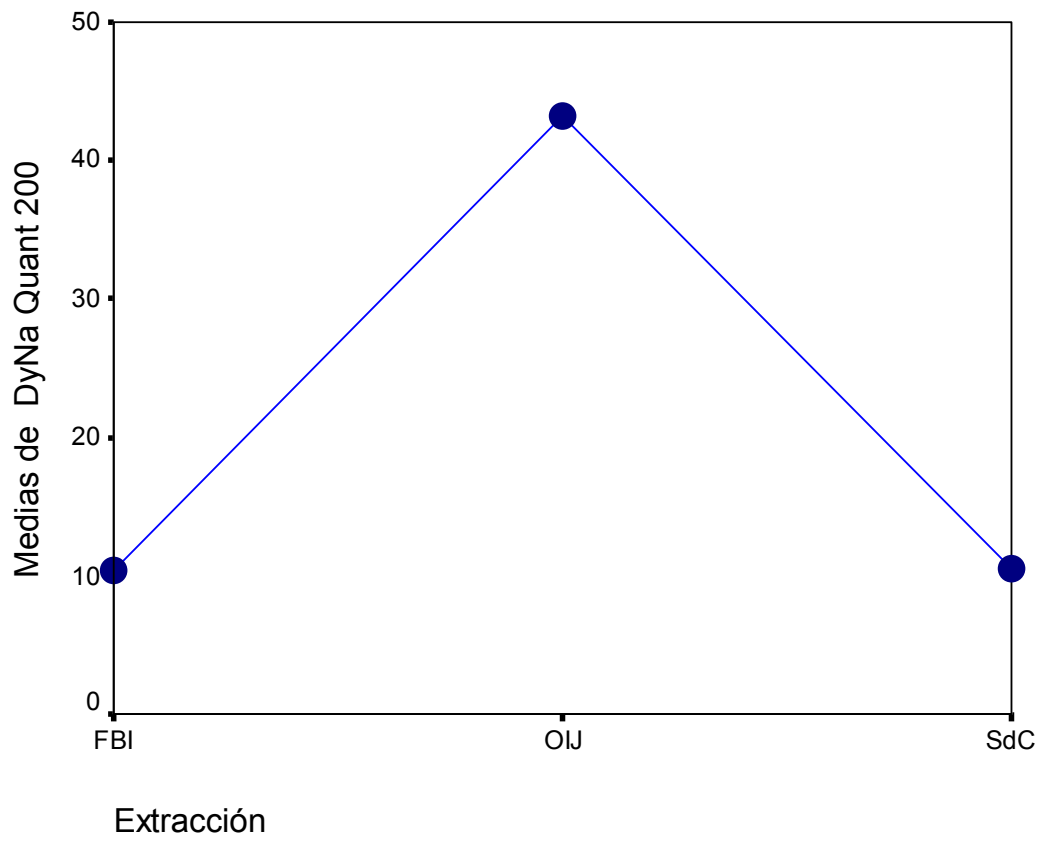
Los resultados de la cuantificación de ácidos nucleicos fueron analizados estadísticamente para buscar diferencias entre los métodos de extracción¹³

DyNA Quant 200

Este método de cuantificación no presentó diferencias significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.063$) para un 95% de confianza en el análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis. Sin embargo, la comparación de medias indica que el método de extracción del OIJ tiende a extraer mayor cantidad de ADN que los otros métodos (gráfica 1).

¹³ Los análisis estadísticos se trabajaron propiamente de la tabla resumen de resultados. Ver anexo.

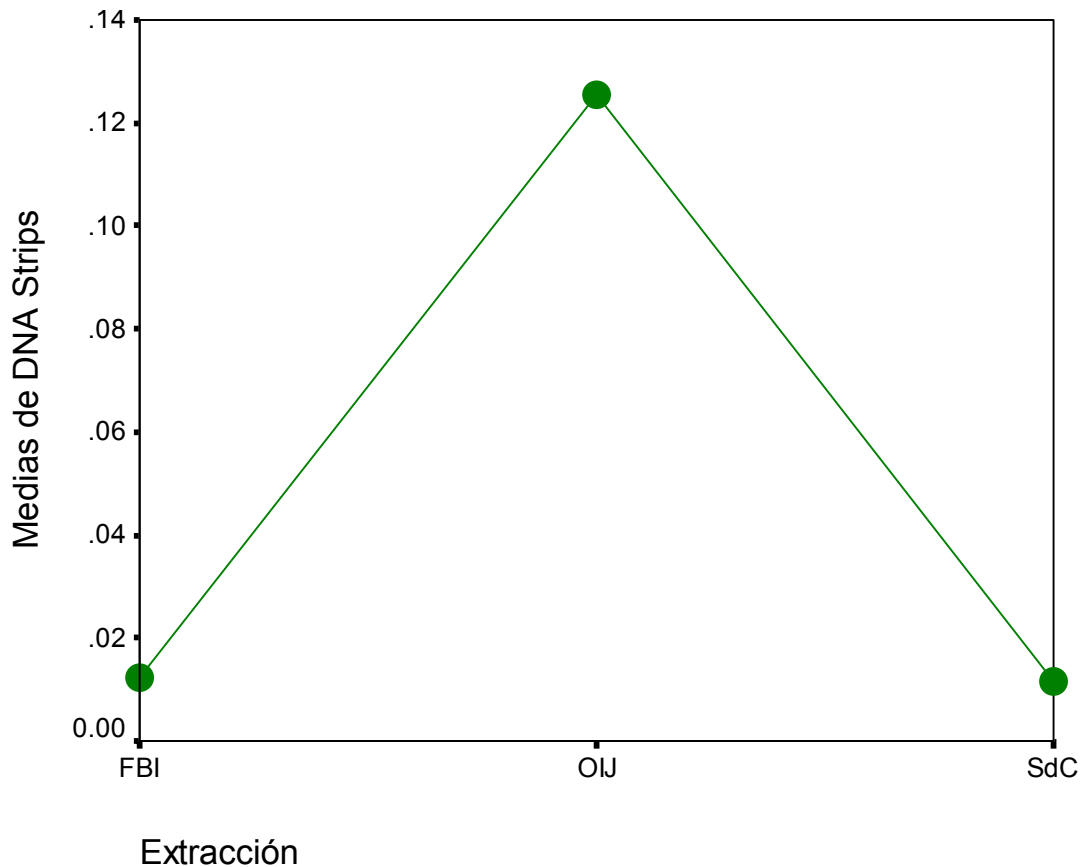
Gráfica 1 Comparación de las medias cuantificadas por el método de DyNA Quant 200 según el método de extracción utilizado.



DNA Strips

Este método de cuantificación si presentó diferencias significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.003$) para un 95% de confianza en el análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis. De manera que sí existe una relación significativa entre la cantidad de ácidos nucleicos cuantificados por este método y el método de extracción utilizado. La comparación de las medias de los métodos de extracción indica que el método del OIJ es el que extrae mayor cantidad de ácidos nucleicos en relación a los otros (gráfica 2).

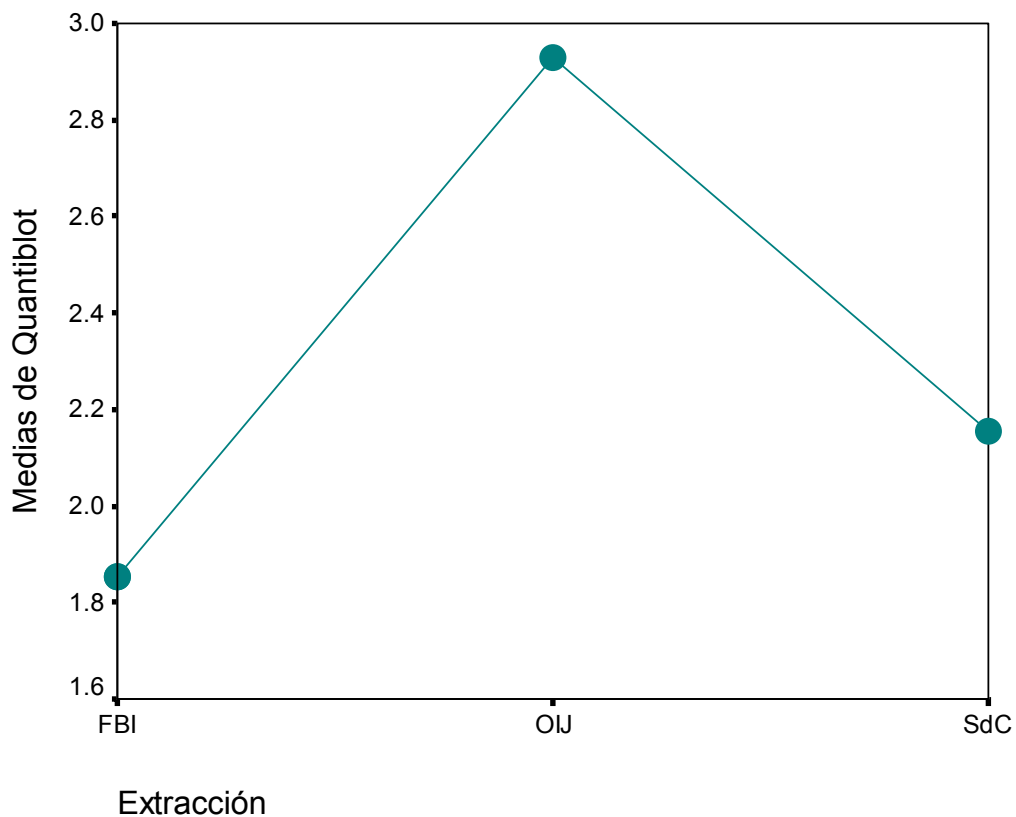
Gráfica 2 Comparación de las medias cuantificadas por el método de DNA Strips según el método de extracción utilizado.



Quantiblot

Este método de cuantificación no reveló diferencias significativas entre los métodos de extracción ($p = 0.599$), para un 95% de confianza (ANOVA). Sin embargo, la comparación de medias sugiere que el método de extracción del OIJ tiende a extraer mayor cantidad de ADN humano que el resto de los métodos (gráfica 3).

Gráfica 3 Comparación de las medias cuantificadas por el método de Quantiblot según el método de extracción utilizado.



En los tres métodos de cuantificación se evidencia, según la comparación de medias, que el método del OIJ es el que extrae mayor cantidad de ácidos nucleicos.

En el análisis de cuantificación no se encontró diferencias significativas entre los métodos de extracción, según la cuantificación de ADN humano (Quantiblot) y la cuantificación de ADN total (DyNA Quant 200); lo que podría deberse a que los métodos de extracción son muy similares, todos se basan

en la extracción fenólica. Por otro lado, sería muy ambicioso el pretender encontrar diferencias significativas entre los métodos, dado que, el número de muestras es muy pequeño y no genera la cantidad de datos necesarios para ver detalladamente el comportamiento de los métodos si se toma en cuenta solo la variable de cuantificación. Sin embargo la cuantificación de ácidos nucleicos totales (DNA Strips) sí presentó diferencias significativas entre los métodos de extracción, además mostró un comportamiento diferente a los otros dos métodos de cuantificación, lo que podría deberse a la cantidad de ARN presente en los extractos, ya que la cuantificación por DNA Strips es mucho más sensible al poseer un ámbito de cuantificación mayor que el método de Quantiblot (que busca solamente ADN humano) y DyNA Quant 200 (que busca cualquier tipo de ADN).

Si bien es cierto, el método DyNA Quant 200 es un método fluorométrico, el cual cuantifica por la absorbancia de luz y debería cuantificar el ARN presente, no obstante este método se basa en la cuantificación de la absorbancia de la sonda H 33258, la cual presenta un pico de absorción a 356 nm y en menor cantidad a 492 nm. Cuando esta sonda se une al ADN presente (mono o bicatenario), los picos de absorbancia cambian a 365 y 458 nm, esta diferencia es la que calcula la concentración del ADN. La sonda H 33258 no se une a las moléculas de ARN¹⁴.

La cantidad de ADN en una célula es conocida y depende del genoma al que corresponda (humano, de arroz, caballo, ratón, etc), sin embargo la cantidad de ARN en una célula no se puede generalizar ya que depende de la actividad metabólica de esa célula en particular.

GeneQuant

Una cuantificación posterior de ARN y proteínas en el GeneQuant, reveló información valiosa, la cual también se analizó estadísticamente para comparar los métodos de extracción.

ARN y Proteínas

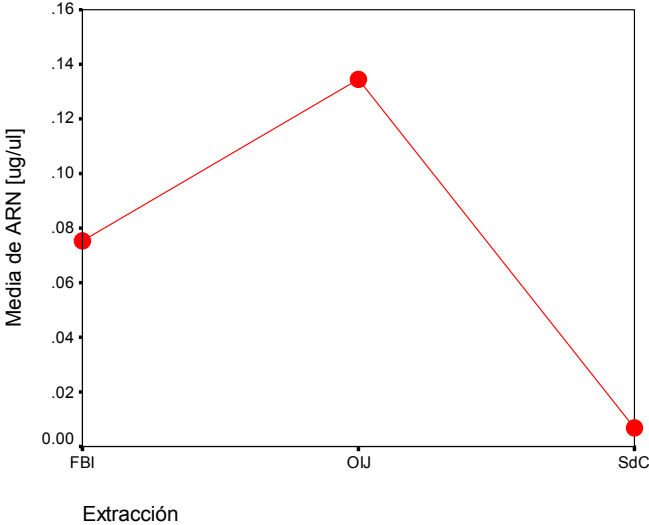
El análisis de ARN presente en los extractos, resultó mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.003$ de Kruskal - Wallis) con una confianza del 95%. La cantidad de ARN presente en los extractos difiere en los tres métodos de extracción. La comparación de

¹⁴ Información obtenida del manual del usuario **HoeflerÆ DyNA Quant® 200**, Fluorometer User Manual, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

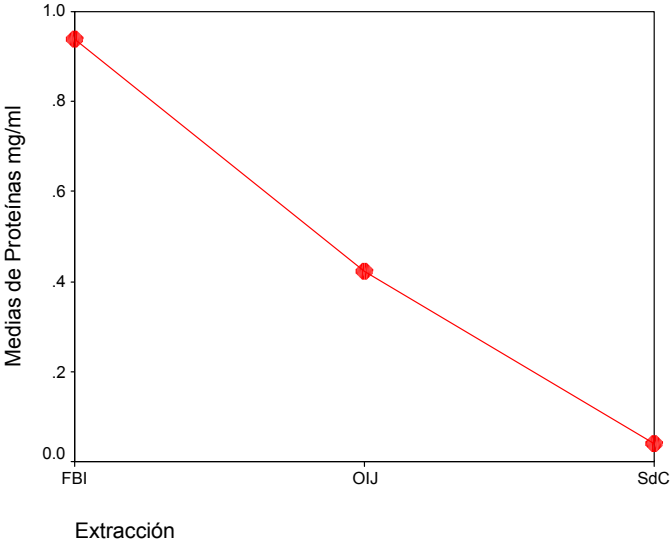
las medias indica que el método del OIJ extrae mayor cantidad de ácidos ribonucleicos (ARN) que los otros métodos.

El análisis de proteínas demuestra con una confianza de 95% que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de extracción; ($p = 0.011$ de Kruskal - Wallis). La cantidad de proteínas presentes en los extractos difiere según el método utilizado, de manera que el método del FBI es el que presenta mayor cantidad de proteínas, seguido por el método del OIJ y por último, el de Santiago de Compostela (gráfica 4 y 5).

Gráfica 4 Comparación de las medias de ARN



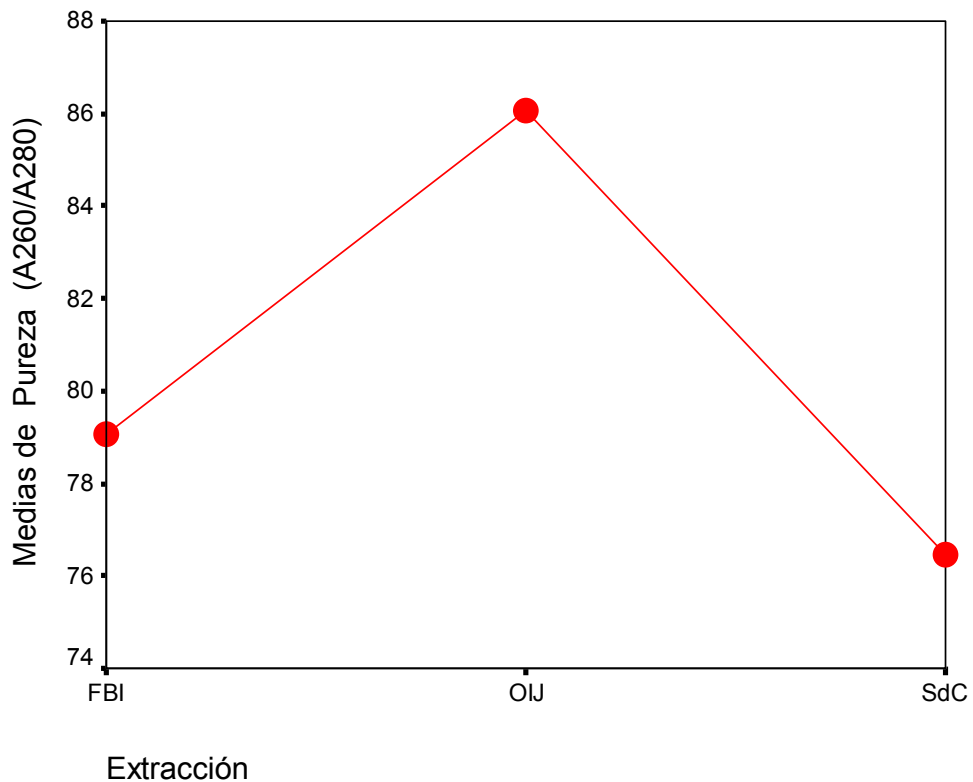
Gráfica 5 Comparación de las medias de proteínas



Pureza del extracto

El análisis del porcentaje de pureza (A260nm/ A280nm) no demuestra diferencias significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.164$ de ANOVA). La comparación de las medias entre los métodos de extracción sugiere que el método del OIJ alcanza el mayor nivel de pureza de los tres métodos (en términos de ARN/proteínas) (gráfica 6).

Gráfica 6 Comparación de las medias del porcentaje de pureza según el método de extracción utilizado.



El análisis de la proporción A260nm/A280nm indica que las muestras procesadas por los métodos de extracción del OIJ y Santiago de Compostela, podrían presentar problemas de contaminación por proteínas ya que sus medias se encuentran por debajo de 1.7; mientras que, el método del FBI tiende a no presentar este tipo de problemas (la media es de 2.303)(Miesfeld, 1999).

El análisis de la proporción A_{260nm} / A_{230nm} indica que las muestras procesadas por el método del OIJ y el de Santiago de Compostela podrían presentar problemas causados por la presencia de carbohidratos, ya que las medias se encuentran por debajo de 2.0. El método del FBI tiende a no presentar problemas por carbohidratos (Miesfeld, 1999).

El análisis de ARN presente en los extractos, el cual presentaba diferencias significativas entre los métodos de extracción, reveló similitud entre las medias de los métodos y la cuantificación de ácidos nucleicos totales (DNA Strips) de los mismos. De esta manera, la significancia encontrada ($p = 0.003$) en el análisis de ácidos nucleicos versus el método de extracción podría deberse a la suma de ADN y ARN presente en lugar de representar solamente la cantidad de ADN que es lo que nos interesa principalmente, porque es el ADN no codificante donde se encuentran las secuencias (STR) que nos permiten identificar a un individuo.

El ARN por otro lado podría funcionar como un obstáculo o estorbo en la amplificación de estas secuencias. Las reacciones moleculares, dependen de la cantidad de choques efectivos entre partículas o moléculas. La reacción de PCR depende de que se forme el complejo ADN-primer para que se inicie la extensión de los amplicones. Los sitios donde se unen los primers son muy pequeños en relación al ADN nuclear, de manera que el ARN u otro tipo de ADN podrían servir de obstáculo en la hibridación de los primers a las secuencias específicas de interés.

Análisis de amplificación entre los métodos

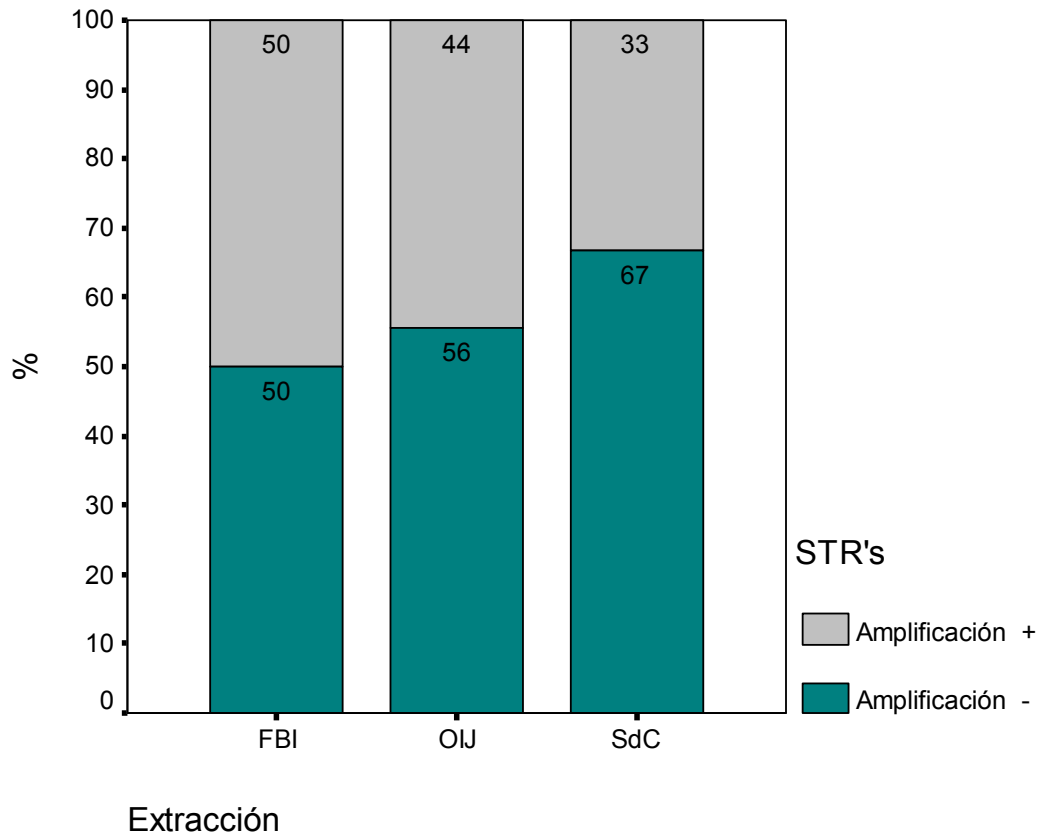
Análisis de los métodos de extracción según los resultados de amplificación

Los resultados de amplificación fueron analizados estadísticamente para buscar diferencias entre los métodos de extracción.

STR's

El análisis estadístico de los resultados de amplificación de los STR no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.589$) según el análisis de Chi-cuadrado. Sin embargo, el método de extracción del FBI tiende a producir mayor cantidad de resultados positivos en la amplificación, según el análisis comparativo de los porcentajes positivos de amplificación (gráfica 7).

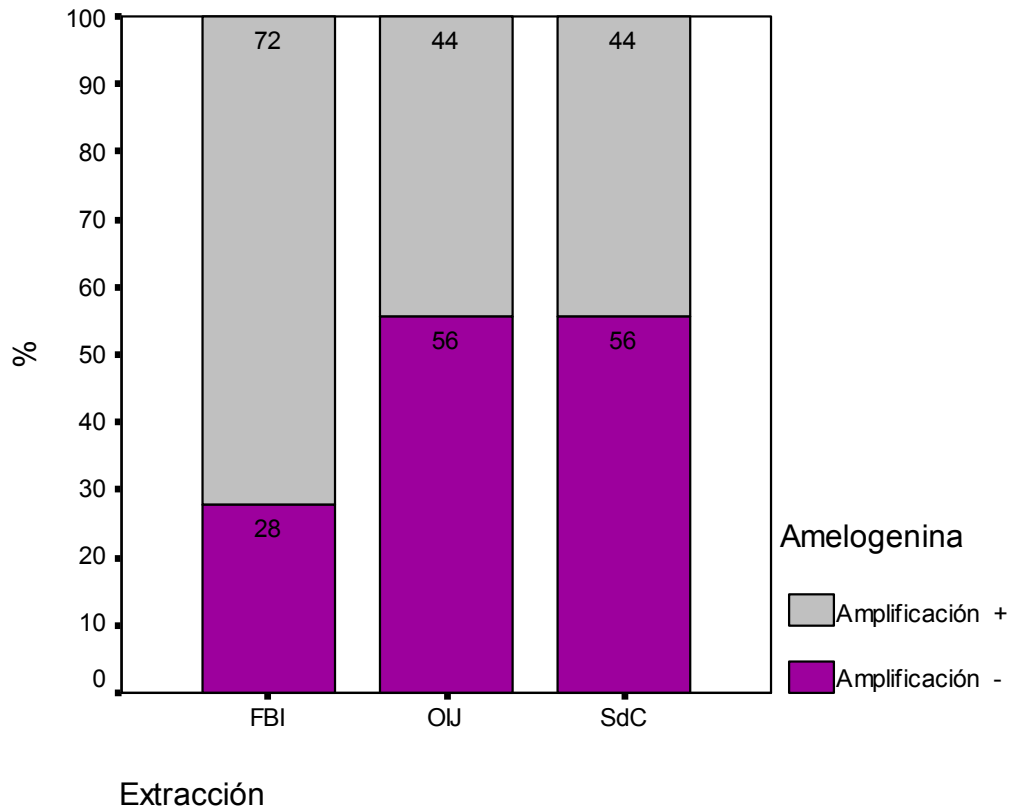
Gráfica 7 Comparación entre los diferentes métodos de extracción según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de STR's.



Amelogenina

El análisis estadístico de los resultados de amplificación de amelogenina, no presentó una diferencia estadísticamente significativa entre los métodos de extracción ya que, $p = 0.155$, según la prueba de Chi-cuadrado. La comparación entre los porcentajes de amplificación sugiere que el método de extracción del FBI es el que produce el mayor número de resultados positivos (gráfica 8).

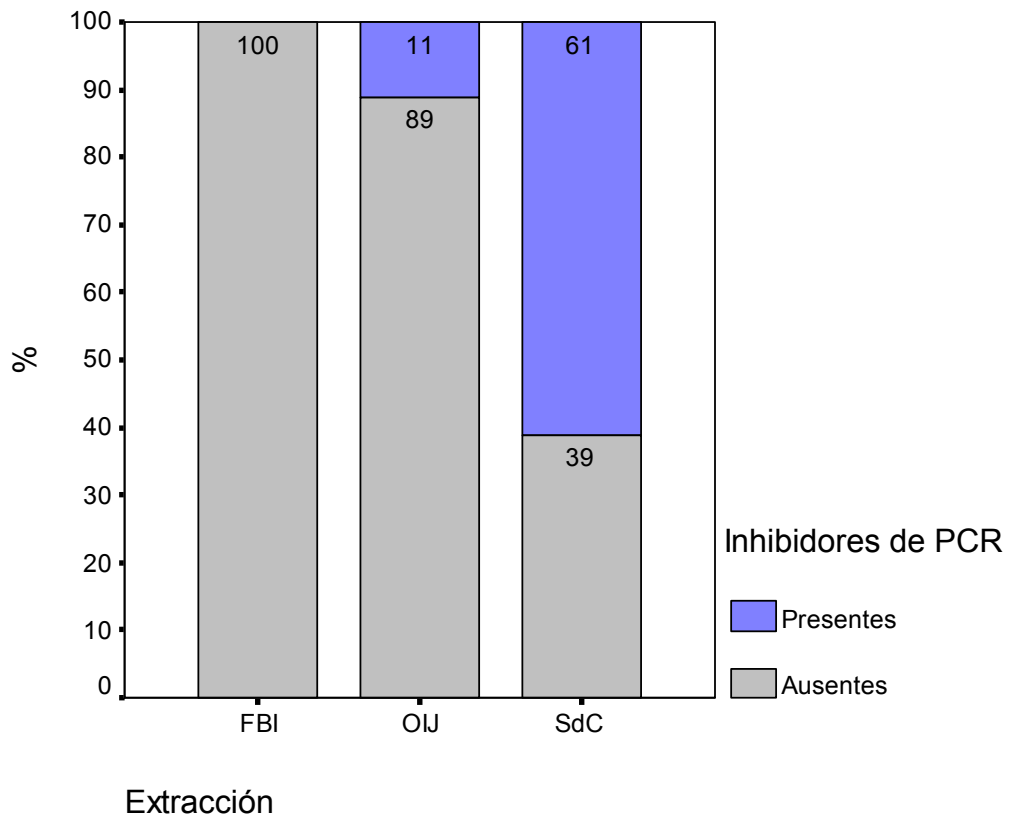
Gráfica 8 Comparación entre los diferentes métodos de extracción según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de Amelogenina.



Inhibidores de PCR

El análisis estadístico de los resultados de inhibición en la amplificación muestran claramente una diferencia significativa entre los métodos de extracción, ($p = 0.0001$) según la prueba de Chi-cuadrado. Los porcentajes de inhibición muestran que los del FBI no presentaron problemas de inhibición (0%), los del OIJ presentaron que un 15,4% de los extractos contenían inhibidores de PCR y un 84,6% los de Santiago de Compostela. El método del FBI es el que logra remover la mayor cantidad de inhibidores de amplificación de las muestras (gráfica 9).

Gráfica 9 Comparación entre los diferentes métodos de extracción según los porcentajes de amplificación positiva y negativa en la búsqueda de inhibidores.



El análisis de la amplificación de STR's y Amelogenina no presentó diferencias significativas entre los diferentes métodos de extracción, esto se puede atribuir a que los métodos son similares, más aún al haber modificado los protocolos para ajustarlos a la disponibilidad de los materiales.

Al método del FBI y al usado en Santiago de Compostela, se les cambió el último paso de purificación a una precipitación de ácidos nucleicos en presencia de acetato de sodio y etanol, este cambio hizo más grande la similitud entre los métodos.

La comparación entre las medias de amplificación de STR y Amelogenina, nos permite ver una diferencia, que aún cuando no es significativa, tiene una relación inversamente proporcional a la presencia de inhibidores, la cual si presentó diferencias significativas. Este hecho nos lleva a la idea de que el éxito de amplificación en PCR radica en el poder remover los contaminantes que inhiben la reacción de la polimerasa. La diferencia de las medias relacionada con los inhibidores, indica una jerarquía entre los métodos, la cual se puede atribuir a la habilidad de remover inhibidores.

El método original del FBI y el de Santiago de Compostela, podrían presentar un aumento en el porcentaje de resultados positivos de amplificación, debido a que el paso final de purificación original, se basa en una técnica que permite extraer el ADN del extracto en lugar de precipitar los ácidos nucleicos y tratar de extraer los contaminantes del medio usando lavados, como se practicó en los tres métodos.

Una técnica que permita extraer el ADN de un medio de extracción que contenga contaminantes, es mucho más prometedora que un método que busque extraer los contaminantes del medio. El extraer el ADN (con una herramienta afín al ADN) del medio de extracción minimiza los problemas de contaminación, ya que no hay problema si no se puede extraer todo el ADN presente en el extracto; por el contrario, si lo que se desea es remover los contaminantes del extracto, se pueden presentar problemas si no se logra extraerlos por completo, ocurriría algún grado de inhibición o amplificación errónea.

El análisis del contenido de proteínas y el análisis de proporción de absorbancia (A_{260nm}/A_{280nm}) y (A_{260nm}/A_{230nm}) permiten identificar parte del problema que se presenta en la amplificación de los extractos, ya que no existe una correlación entre la cantidad de ADN presente en los extractos, según el método con que se recuperó y los resultados positivos de amplificación en PCR (STR's y Amelogenina).

La presencia de proteínas en los extractos es indicador de una deficiencia en el método, ya que el método fenólico es de desproteínización. Sin embargo,

el análisis de pureza (A260/A280), no presentó diferencias significativas entre ellos. Esta pureza se mide en términos de ácidos nucleicos versus proteínas. Ahora bien, en el método del FBI se observan los mejores resultados de amplificación, sin poseer la mayor cantidad de ADN respecto a los otros métodos. También presentó la mayor cantidad de proteínas, de manera que no se puede concluir que las proteínas sean los contaminantes causantes de la inhibición de la reacción de la polimerasa (PCR).

El análisis de proporción A260/A280, también es una relación entre ácidos nucleicos y proteínas. Según Miesfeld (1999) al presentar una relación de proporción superior a 1.7, no existe una contaminación proteínica, lo cual es el caso del método del FBI, reflejado en el buen desempeño de amplificación logrado.

Al no haber diferencias significativas en cuanto al porcentaje de pureza, significa que los métodos son muy similares en esta variable, lo que nos puede llevar a que la cantidad de proteínas presentes en los extractos no logra alcanzar una concentración que indique que estos sean los contaminantes principales que inhiben la reacción del PCR. Las proteínas en este caso podrían ser una parte de la causa de la inhibición y no los causantes principales.

El análisis de proporción de absorción entre A260nm y A230nm, propone una contaminación por inhibición de PCR. Los métodos utilizados por el OIJ y Santiago de Compostela presentan medias de proporción inferiores a 2.0, donde Miesfeld (1999), indica en su tabla de relación que los extractos pueden presentar problemas por el contenido de carbohidratos. La proporción A260nm/A230nm presenta además una correlación con los resultados de amplificación según los métodos de extracción.

Estos resultados nos llevan a concluir que los problemas de inhibición presentes en los ensayos, tienen una relación con la concentración de carbohidratos en los extractos.

Podría asumirse que los métodos de extracción difieren en cuanto a la habilidad de remover carbohidratos.

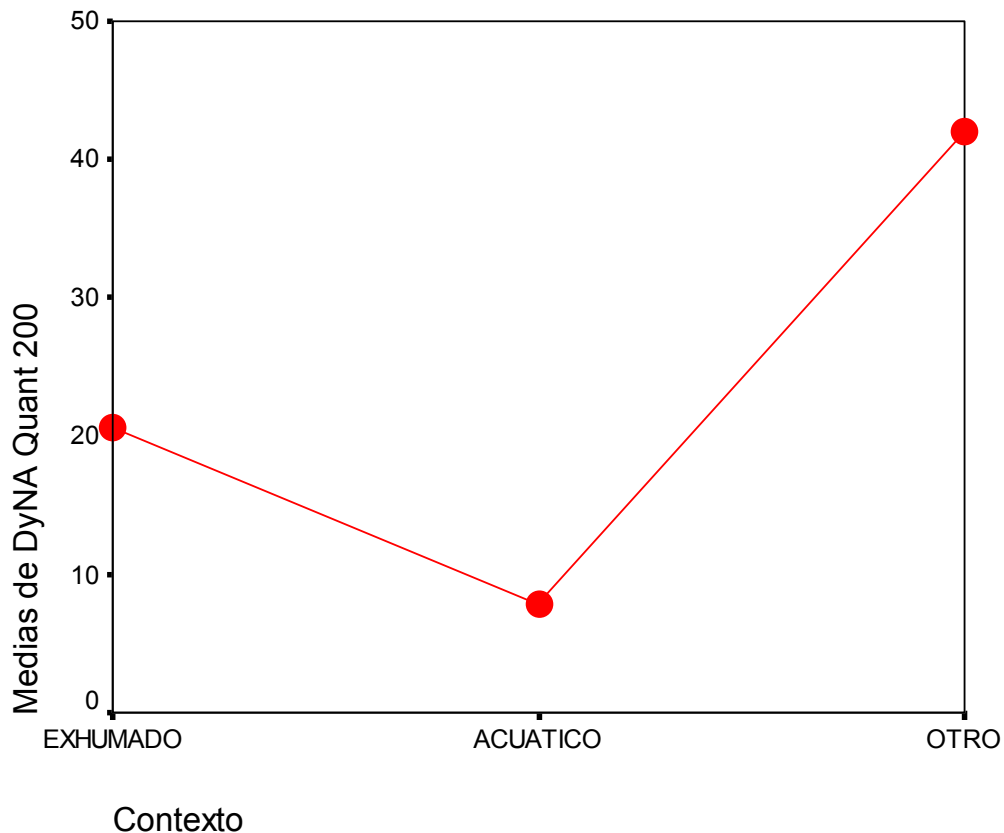
Análisis de la influencia del contexto de las muestras sobre los extractos.

[Análisis del contexto de las muestras según las diferentes cuantificaciones](#)

DyNA Quant 200

Este método de cuantificación presentó diferencias significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.002$) para un 95% de confianza en el análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis. De manera que si existe una relación significativa entre la cantidad de ADN cuantificado y el contexto de la muestra. La comparación de medias indica que el contexto “otro” proporciona mayor cantidad de ADN en la extracción que los otros contextos (gráfica 10).

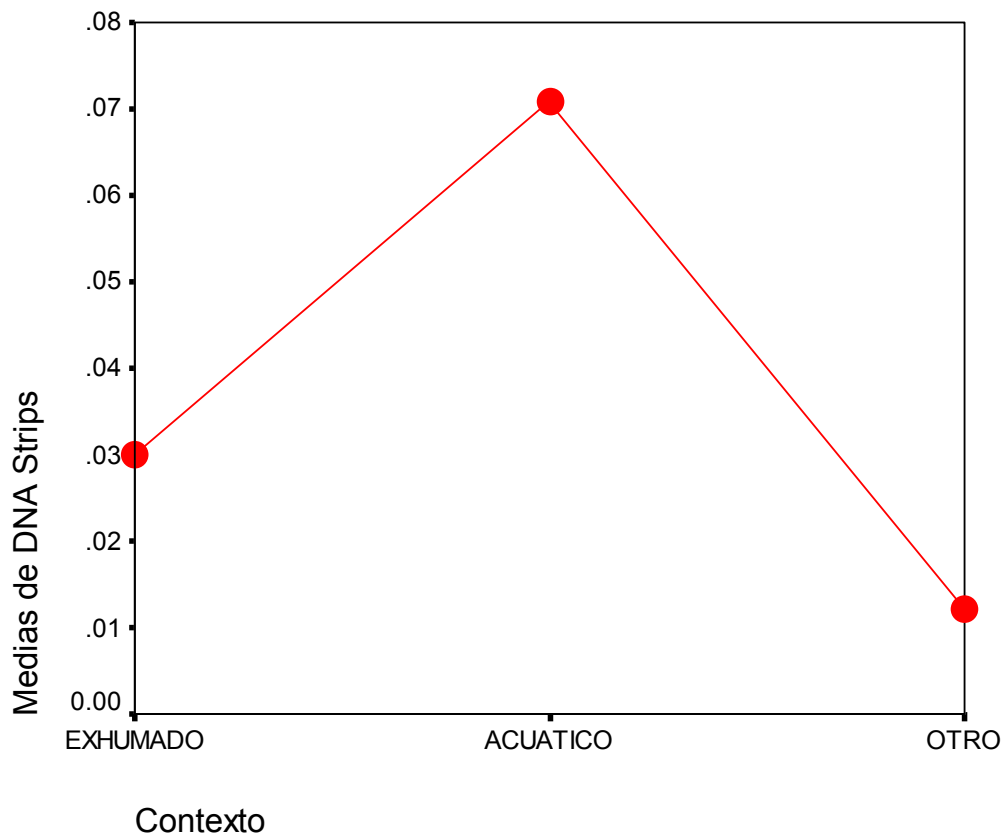
Gráfica 10 Comparación de las medias cuantificadas por el método de DyNA Quant 200 según el contexto de las muestras



DNA Strips

Este método de cuantificación no presentó diferencias significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.123$) para un 95% de confianza en el análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis. Sin embargo, la comparación de medias sugiere que el contexto "Acuático" proporciona mayor cantidad de ácidos nucleicos que el resto de los contextos (gráfica 11).

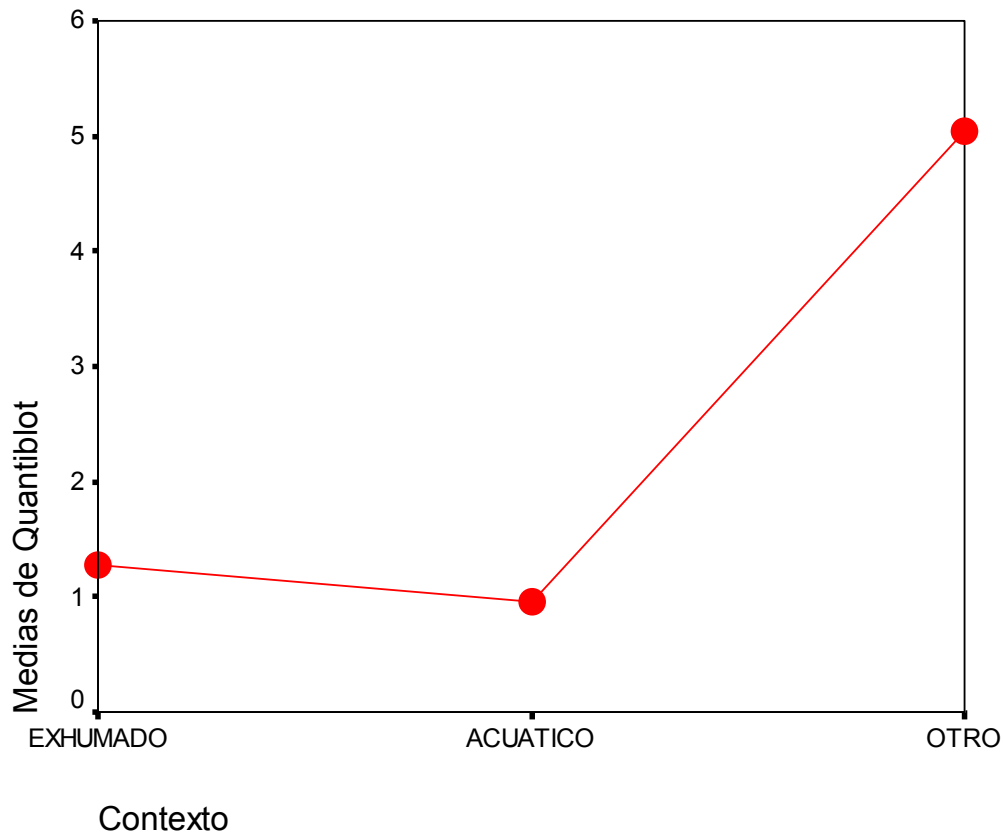
Gráfica 11 Comparación de las medias cuantificadas por el método de DNA Strips según el contexto de las muestras



Quantiblot

Esta cuantificación presentó diferencias significativas entre los métodos de extracción; ($p = 0.0001$) para un 95% de confianza (ANOVA). Si existe una relación significativa entre la cantidad de ADN cuantificado y el contexto de la muestra. La comparación de medias sugiere que el contexto “otro” proporciona mayor cantidad de ADN humano en la extracción que el resto de los métodos (gráfica 12).

Gráfica 12 Comparación de las medias cuantificadas por el método de Quantiblot según el contexto de las muestras



Los análisis de cuantificación (Quantiblot y DyNA Quant 200) presentaron diferencias entre los contextos, además mostraron un comportamiento similar entre las medias de los contextos cuantificados. Sin embargo la cuantificación de los ácidos nucleicos totales (cuantificación por DNA Strips) no presentó diferencias significativas entre los contextos y la jerarquía entre

las medias difiere a los otros dos tipos de cuantificación. Esta diferencia podría basarse en el tipo de moléculas que cuantifica cada método. Por ejemplo, el Quantiblot solo toma en cuenta el ADN de origen Humano y el DyNA Quant 200 aún cuando cuantifica cualquier tipo de ADN, no toma en cuenta el ARN.

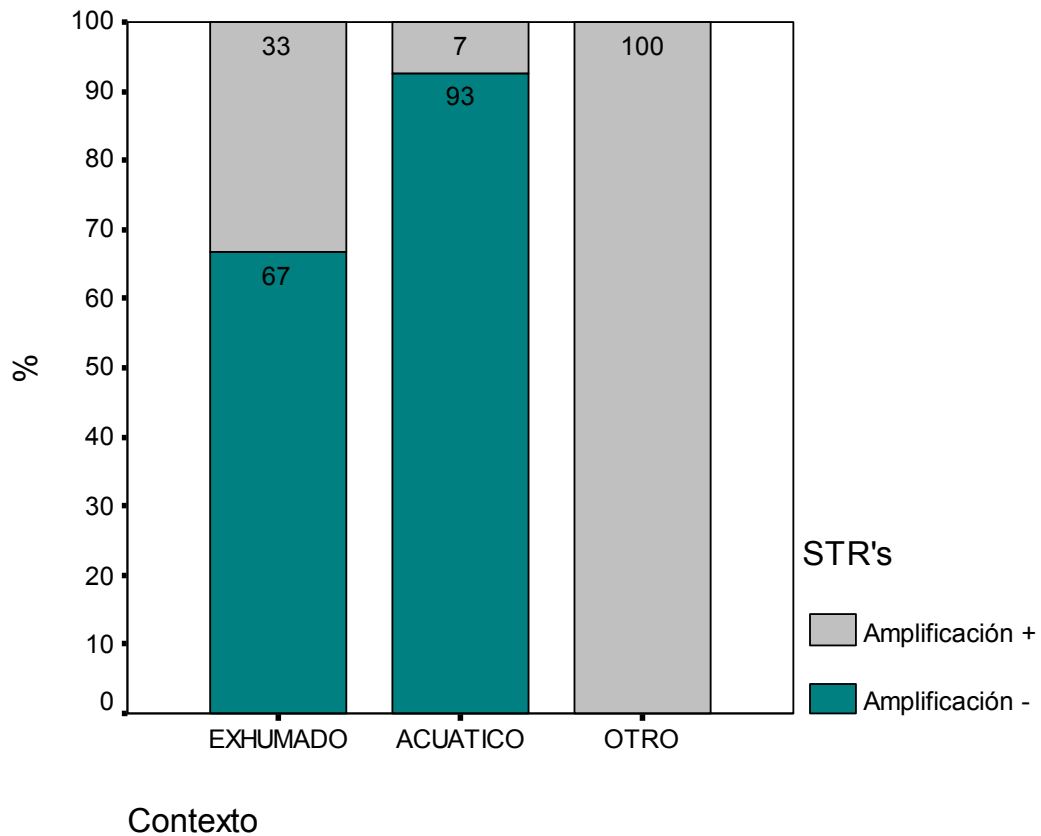
Si la diferencia encontrada no se debe a la cantidad de ARN presente (por falta de diferencias significativas), podría proponerse la posibilidad de presencia de ADN microbiano.

Análisis del contexto de las muestras según los resultados de amplificación

STR's

El análisis estadístico (Chi-cuadrado) de la amplificación de STR's según el contexto de la muestra, mostró que existen diferencias estadísticamente significativas; ($p = 0.0001$). Del 100% de los resultados positivos de amplificación, el 13% pertenece a los huesos que se encontraron enterrados, el 8.7% pertenece a los huesos que se encontraron en algún río o represa (ambiente acuático) y el 78.3% pertenece a los huesos encontrados en ambientes diferentes a los mencionados anteriormente (básicamente expuestos sobre el suelo) (gráfica 13).

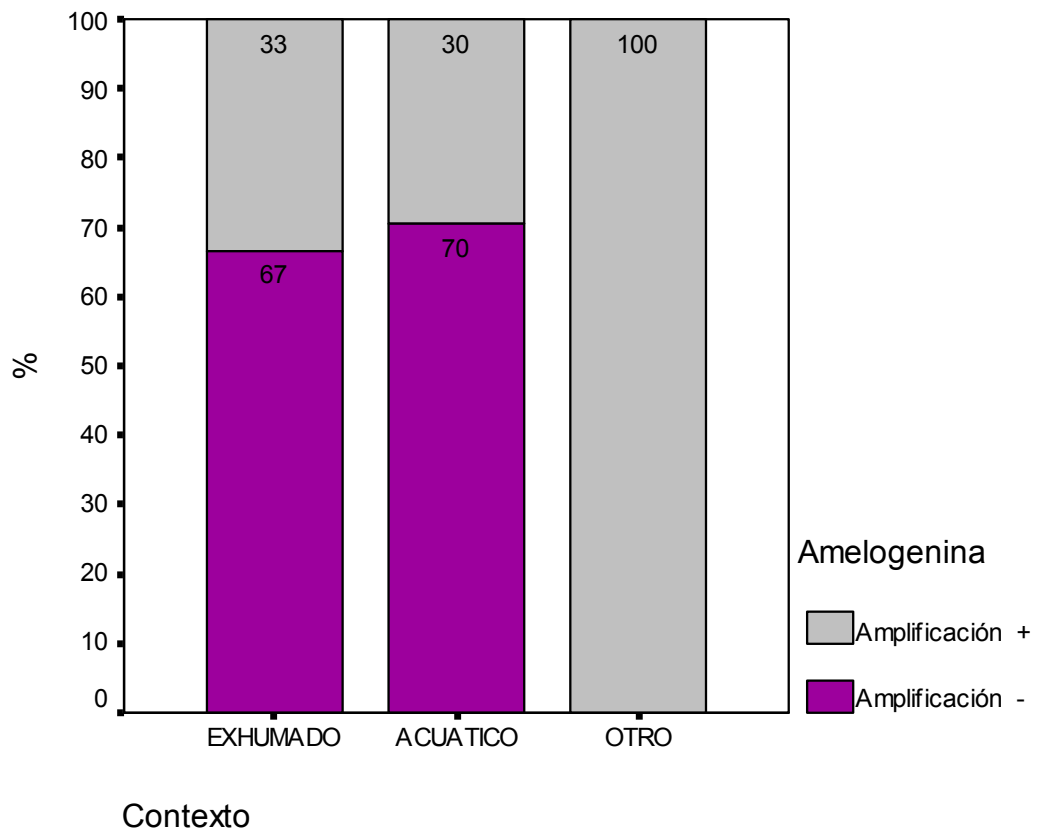
Gráfica 13 Comparación entre los diferentes contextos, según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de STR's.



Amelogenina

El análisis de Chi-cuadrado de la amplificación de amelogenina, según el contexto de la muestra, señala que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los mismos ($p = 0.0001$). Existe una relación entre la cantidad de resultados positivos de amplificación de este marcador genético y el contexto donde se encontró la muestra. Los huesos que presentaron menor cantidad de resultados positivos son los clasificados como contexto "exhumado", los siguientes en la escala de resultados positivos son los de contexto clasificado como "acuático" y los que presentaron mayor cantidad de resultados positivos son los clasificados como "otros" (gráfica 14).

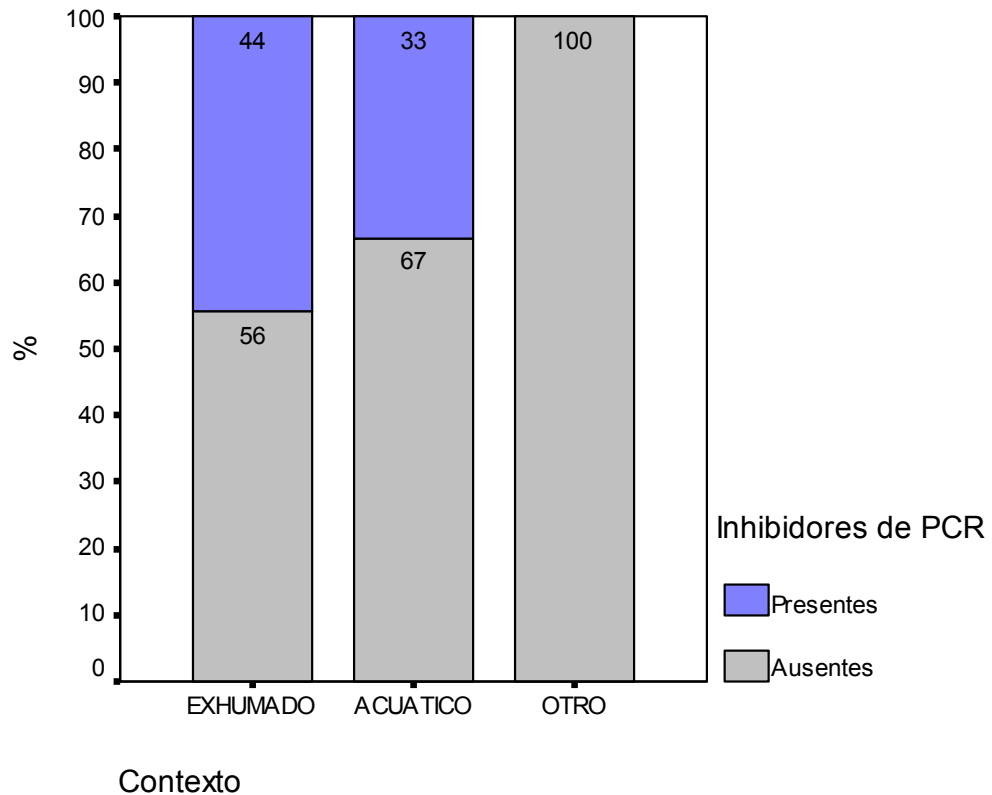
Gráfica 14 Comparación entre los diferentes contextos, según los porcentajes de amplificación positiva y negativa de Amelogenina.



Inhibidores de PCR

El análisis de Chi-cuadrado para la presencia de inhibidores de PCR según el contexto de la muestra, señala que existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.011$). El análisis descriptivo deja ver que los huesos del contexto “acuático” presenta el mayor porcentaje de resultados negativos de amplificación por inhibidores (44.4%), los del contexto “exhumado” presentan un 33.3%, sin embargo, los huesos del contexto “otros”, no presentan resultados negativos de amplificación por inhibidores de PCR (gráfica 15).

Gráfica 15 Comparación entre los diferentes contextos, según los porcentajes de amplificación positiva y negativa en la búsqueda de inhibidores.



El análisis de la amplificación en PCR, según el contexto mostró un comportamiento de medias similar a la cuantificación por Quantiblot y DyNA Quant 200. Este análisis demostró además la existencia de diferencias significativas entre los contextos que correlacionan con la cantidad de ADN encontrado.

El análisis de la presencia de inhibidores, el cual es significativo en cuanto a diferencias entre contextos, tiene un comportamiento inversamente proporcional a los resultados de amplificación y los de cuantificación (Quantiblot y DyNA Quant 200); de manera que existe una relación directa entre estas variables analizadas desde el punto de vista de contexto.

Proporción A260nm/A280nm y A260nm/A230nm

El análisis de la proporción A260nm /A280nm indica que los contextos de tipo acuático y enterrado podrían presentar problemas ya que, los extractos contienen proteínas, evidenciado porque las medias de estos contextos se encuentran por debajo de 1.7. El contexto “otros” no tiende a presentar problemas por proteínas en los extractos (media: 1.813).

El análisis de la proporción A260nm/A230nm indica que todos los contextos podrían presentar problemas, ya que, los extractos contienen carbohidratos en alguna medida. Las medias de todos los contextos se encuentran por debajo de 2.0.

Los resultados se refuerzan al incorporar la información del contenido de proteínas y carbohidratos (proporción de absorbancia), que indica la existencia de contaminantes de este tipo en los contextos “acuático” y “exhumado”, mientras que el contexto “otro” solo posee contaminación por carbohidratos.

El análisis estadístico de contexto en general, muestra que los medios en donde se encontraban los huesos influyen diferencialmente sobre la extracción de los ácidos nucleicos y en la cantidad de contaminantes (al menos proteínas y carbohidratos) presentes.

Si se toman las reacciones negativas de amplificación, que no presentaron problemas de inhibición, según el contexto, se observa que el contexto “acuático” presenta el mayor porcentaje (64%), luego “exhumado” (33%) y “otro” (0%). Ya que todos los extractos presentaron alguna cantidad de ácidos nucleicos en los análisis de cuantificación, no se puede concluir que estos porcentajes se deban a la ausencia de ADN, sin embargo podrían

presentarse problemas por la presencia de ADN no humano o ADN degradado.

Los contextos “acuático” y “exhumado”, mostraron ser los más problemáticos. Ahora bien, si el problema de amplificación radica en la degradación del ADN (el cual no se pudo comprobar), se podría tratar de analizar el ADN mitocondrial (ADNmt) en lugar del nuclear, ya que, las características del ADNmt prometen una mayor probabilidad de encontrarlo conservado. Posiblemente se disminuiría la cantidad de resultados negativos de amplificación y se obtendría más información de las muestras, aún de las que presentan un contexto influyente.

En todos los análisis de contexto, el contexto “otro” es quien presenta las mejores condiciones de recuperación de ADN, de modo que no solo posee menor contaminación, sino que el ADN está mejor conservado para su amplificación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El análisis de resultados permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- El método del FBI logra obtener las concentraciones óptimas de ADN, libre de contaminantes de tipo carbohidratos. Este método es el que logra las mejores condiciones para el ADN de la muestra.
- El método usado por el OIJ es el que logra extraer la mayor cantidad de ácidos nucleicos, pero no están libres de inhibidores de PCR.
- El método utilizado por la Universidad de Santiago de Compostela es el menos eficiente según esta investigación.
- Todos los métodos de cuantificación lograron estimar la cantidad de ácidos nucleicos (ADN, ADN humano y ácidos nucleicos totales según el método), presentes en las muestras. Sin embargo, ninguno logra identificar la cantidad de ADN que realmente es útil en la amplificación de STR's y Amelogenina, ya que, ningún método de cuantificación toma en cuenta los factores de inhibición o degradación del ADN.
- Se confirmó que el exceso de moléculas de ARN, ADN microbiano o fúngico y las proteínas podrían servir como obstáculos en la formación del complejo *primer* – ADN humano en la reacción de PCR.
- El análisis de inhibidores de PCR, logró identificar la presencia de contaminantes que perjudican la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en los extractos.
- Donde no hubo problemas por inhibidores de PCR, se estima que el ADN está degradado o no es ADN humano.
- En alguna medida, se logró obtener ADN amplificable en la PCR en los tres métodos.
- Las diferencias entre los métodos de extracción no están muy marcadas debido al número de muestras (muy pequeño) y a la similitud entre los métodos.

- El contexto de las muestras influye diferencialmente sobre las mismas. Las diferencias entre los contextos son más pronunciadas que entre los métodos de extracción.
- Las muestras clasificadas como “otros” presentan las mejores condiciones de ADN para la amplificación en PCR para STR's y Amelogenina. Además no presenta problemas de inhibición en PCR.
- Los contextos “exhumado” y “acuático” se comportan similarmente entre ellos, en la amplificación de amelogenina, pero difieren en la amplificación de STR's y la presencia de inhibidores.
- El contexto “acuático” es el más problemático en la amplificación de STR's y Amelogenina, lo que supone que el ADN está degradado.
- El contexto “exhumado” presenta la mayor cantidad de inhibidores de PCR.

Recomendaciones

- Para las prácticas de identificación forense, se recomienda el uso del Quantiblot para la detección de ADN humano, junto con el GeneQuant que logra estimar ciertos niveles de contaminación en la muestra. El uso de ambos, podría generar los estándares o patrones necesarios, que permitan estimar la cantidad de ADN útil en la producción de perfiles genéticos.
- Se recomienda hacer diluciones en las muestras antes de montar el PCR, para disminuir la cantidad de contaminantes.
- Se recomienda el uso de las columnas de purificación en la extracción.

BIBLIOGRAFÍA

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. 1994. Molecular Biology of THE CELL. New York, USA. Garland Publishing. 1294p.

BIRNEY, E.; BATEMAN, A.; CLAMP, M.; HUBBARD, T. 2001. Mining the draft human genome. Nature. London. 409(6822): 827- 828.

BUTLER, J. 2001. Forensic DNA Typing; Biology & technology behind STR Markers. California, USA. Academic Press. 322p.

CATTANEO, C.; CRAIG, O.; JAMES, N.; SOKOL, R. 1997. Comparison of Three DNA Extraction Methods on Bone and Blood Stains up to 43 Years Old and Amplification of Three Different Gene Sequences. Journal of Forensic Sciences. LUGAR . 42(6): 1126-1135.

COLSON, I.; BAILEY, J.; VERCAUTEREN, M.; SYKES, B.; HEDGES, R. 1996. The Preservation of Ancient DNA and Bone Diagenesis. Ancient Biomolecules. Netherlands. 1(2): 109-117.

FAWCETT, D. 1990. Tratado de Histología; Bloom – Fawcett. México, México. Nueva Editorial Interamericana, S.A. 1026p.

JEFFREYS, A.; PENA, S. 1993. Brief introduction to human DNA fingerprinting. IN DNA FINGERPRINTING: State of the Science. Swizerland.

JEFFREYS, A 1985. Individual – specific “fingerprints” of human DNA. Nature. 316: 76- 79.

LASSEN, C.; HUMMEL, S.; HERRMANN, B. 1996. PCR Based Sex Identification of Ancient Human Bones by Amplification of X- and Y-Chromosomal Sequences: A Comparison. Ancient Biomolecules. Netherlands. 1(1): 25-33.

MADIGAN, M.; MARTINICO, J.; PARKER, J. 1998. BROCK; Biología de los microorganismos. Madrid, España. Prentice Hall. 1 064P.

MATAMOROS, M. 1999. Frecuencias Alélicas de los *loci* de repeticiones cortas en tandem en la población hondureña: su aplicación forense. Tesis Magíster Scientiae. San José, CR. Universidad de Costa Rica. 94p.

MIESFELD, R. 1999. Applied Molecular Genetics. New York, USA. John Wiley & Sons, INC. 293p.

NAKAMURA, Y. 1987. Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for human gene mapping. Science. 235: 1616- 1622.

ROJAS, E. 1995. Análisis de marcadores polimórficos de ADN para pruebas de identidad. Tesis Magíster Scientiae. San José, CR. Universidad de Costa Rica. 171p.

ANEXO

Modificación del protocolo de Extracción de ADN de restos óseos según el FBI (1998) (Acondicionado al laboratorio de Ciencias Forenses del OIJ)

1. Una vez pulverizada la muestra con el Freezer/Mill, agregue 2 g de la muestra pulverizada a un tubo Falcon de 50 ml. Monte un blanco o control en otro tubo.
2. Agregue 6ml de SEB (stain extraction buffer) buffer de extracción de manchas y 48 µl de proteinasa K [50 mg/ml] a los tubos Falcon.
3. Agite en el vortex brevemente y centrifugue los tubos para forzar a los fragmentos de hueso en el SEB.
4. Incube a 56 °C por 2 horas como mínimo y 24 como máximo. (Use el baño con agitador)
5. Remueva los tubos del baño y centrifugue brevemente.
6. Extraiga el sobrenadante y deposítelo en un nuevo tubo
7. Agregue 6ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamilo (PCIA, 25:24:1) a cada tubo. PCIA es irritante y tóxico. Tome las medidas pertinentes, como cámara de extracción de gases, guantes, mascara, etc.
8. Agite en el vortex por 30 segundos para obtener una emulsión lechosa, luego centrifugue los tubos por 5 minutos a 10 000X g.
9. Extraiga el sobrenadante y deposítelo en un nuevo tubo, debidamente rotulado.
10. En lugar de utilizar los concentradores microcon o centricon, precipite los ácidos nucleicos con Acetato de Sodio 3 M, para una concentración de 0.3 M. Agregar 2½ volúmenes de etanol absoluto frío. Dejar a -20°C, al menos toda la noche.
11. Centrifugue a 10 000x g, por 5 minutos.
12. Hacer tres lavados con etanol de 70°, al botón extraído en el paso anterior, eliminar al máximo el sobrenadante y secar al vacío o en

incubadora a 37 °C, en ambos casos quitar la tapa del tubo durante el secado. Si se seca al vacío dejar 5 minutos a 45 °C.

13. Resuspender en agua destilada, unos 100 µl.

Extracción fenólica de ADN a partir de restos óseos (OIJ)

PROCEDIMIENTOS:

Si los huesos vienen con restos de músculo aún, se deben poner en SDS al 10%, aproximadamente por 2 horas. Eliminar con bisturí los restos de músculo. Poner en etanol absoluto. Dejar secar a temperatura ambiente.

Se deben limpiar las brocas con un cepillo grueso y jabón y luego ponerlas en alcohol.

Una vez pulverizado el hueso con el FREEZER/MILL.

- 1- Poner el hueso pulverizado en un tubo de 50ml de polipropileno estéril, nuevo, agregar 7.5 ml de High TE y un volumen igual de buffer lisis, así como 750 µl de proteinasa K 10 mg/ml, para una concentración de 0.5 mg/ml.
- 2- Dejar en agitación a 55 °C de 24 a 72 horas.
- 3- Centrifugar y tomar el sobrenadante, descartar el sedimento.
- 4- Poner el sobrenadante de nuevo en un tubo de 50ml debidamente rotulado, agregar un volumen igual de fenol saturado, agitar invirtiendo vigorosamente. Centrifugar a 3500 rpm por 20 minutos a 4 °C.
- 5- Pasar el sobrenadante a un tubo de 50 ml debidamente rotulado, agregar un volumen igual de Fenol-Cloroformo- alcohol isoamilo (25:24:1), agitar invirtiendo vigorosamente. Centrifugar a 3500 rpm por 20 min a 4 °C.
- 6- Poner el sobrenadante en un tubo de 50 ml debidamente rotulado, y agregar un volumen igual de Cloroformo-alcohol isoamilo (24:1), agitar vigorosamente y centrifugar igual que en los pasos anteriores.
- 7- Precipitar el sobrenadante agregando Acetato de Sodio 3 M para una concentración de 0.3 M. Agregar 2¹/₂ volúmenes de etanol absoluto

frío. Dejar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, al menos toda la noche.

- 8- Centrifugar como en los pasos anteriores y descartar el sobrenadante, menos unos $200\text{ }\mu\text{l}$. Agitar el tubo para desprender el botón de ADN y pasar el botón a un microtubo de 1.5 ml con una punta azul mocha.
- 9- Agregar al tubo de 50 ml , $500\text{ }\mu\text{l}$ de etanol absoluto para recuperar la mayor parte del ADN que se separó del botón.
- 10- Hacer 3 lavados con etanol de 70 ° , eliminar al máximo el sobrenadante y secar al vacío o en incubadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en ambos casos quitar la tapa del tubo durante el secado. Si se seca al vacío dejar 5 min a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 11- Agregar de 50 a $100\text{ }\mu\text{l}$ de TE pH 7.2 dependiendo del tamaño del botón Si se sospecha de material muy degradado, resuspender en agua destilada estéril para poder agregar volúmenes mayores de ADN en la reacción de PCR. Esto porque el TE tiene en su composición EDTA y si está el TE en una proporción mayor al 20 , el EDTA secuestra el magnesio necesario para la actividad de la taq polimerasa. Incubar en baño de agua a 37°C con agitación, al menos por 30 min .

Extracción fenólica de ADN utilizada en la Universidad de Santiago de Compostela

(Modificado para no utilizar Centricones. Se precipita con Acetato de Sodio)

Para la extracción de ADN a partir de restos óseos, se debe limpiar y pulverizar el hueso, tomando en cuenta las especificaciones del Freezer/mill sugeridas por la casa fabricante.

Seguidamente, se debe preparar la mezcla de extracción. Se recomienda utilizar puntas de micropipeta con algodón o filtro.

Reactivo	Volumen por reacción	
DTT 1 M	4 ml	
EDTA 0.5 M pH 8	160 μ l	
SDS 10%	280 μ l	
Proteinasa K 20 mg/ml	100 μ l	

Se debe poner el mezcla en un baño María para disolver bien, de ser necesario.

- Usar 2 g de muestra por tubo (falcon de 50 ml) y agregar 4 ml de mezcla a cada tubo.
- Sellar con parafilm; y mezclar en el vortex hasta homogenizar.
- Incubar en un baño María con agitación a 56 °C
- Transcurridas 2 horas, se debe agregar unos 25 μ l más de Proteinasa K
- Incubar de 16 a 24 horas.

- Agitar cada tubo brevemente en el vortex.
- Centrifugar a 3 000 rpm por 10 min.
- Conservar el sobrenadante completo y pasarlo a un eppendorf (debidamente identificado) (se obtienen mínimo 2 eppendorf por muestra; unos 1200 μ l)
- A los tubos falcon de 50 ml, agregar 1 ml de EDTA.
- Homogenizar con el vortex.
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.

- Recoger sobrenadante en otros viales.

- Añadir 200 μ l de Fenol / Cloroformo / Alcohol Isoamilo a cada eppendorf.
- Agitar con el Vortex.
- Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.
- Recoger la fase acuosa superior (sobrenadante) y poner en un vial de 1.5 ml tipo eppendorf (unos 500 μ l).
- Precipitar el sobrenadante agregando Acetato de Sodio 3 M para obtener una concentración de 0.3 M. Agregar 2 1/2 volúmenes de etanol Absoluto frío. Dejar a -20 °C , al menos toda la noche.

- Centrifugar como en los pasos anteriores y descartar el sobrenadante. Agregar 500 μ l de etanol absoluto para reagrupar y lavar el botón.
- Hacer tres lavados con etanol de 70 °, eliminar al máximo el sobrenadante y secar al vacío o en incubadora a 37 °C (sin tapar)
- Lavar con agua estéril destilada y desionizada.
- Resuspender con TE pH 7.2 (de 50 a 100 μ l según el tamaño del botón). Si se sospecha que el material esta degradado, entonces de debe resuspender el agua destilada, desionizada y estéril.
- Incubar a 37 °C por media hora.

Protocolos de amplificación para STR y Amelogenina utilizados en el Termociclador GeneAmp 9700 del Laboratorio de Bioquímica del Complejo de Ciencias Forenses del OIJ.

Protocolo	Incubación Inicial		Tiempos de Rampa Programados	20 últimos ciclos	Paso de Extensión	Mantener a:
STR IV y Amelogenina	96°C por 2 minutos	Rampa predeterminada a 94°C 1 min 30 segundos a 64°C 1 min 15 segundos a 70°C 1.5min	45 segundos a 90°C 1 min 26 segundos a 64°C 1min 15 segundos a 70°C 1.5min		60°C por 30min	4°C
STR III	96°C por 1 minuto	Rampa predeterminada a 94°C 1 min 68 segundos a 60°C 30sec 50 segundos a 70°C 45sec	Default ramp a 90°C 30sec 60 segundos a 60°C 30sec 50 segundos a 70°C 45sec		60°C por 30min	4°C

Mezcla para la reacción de PCR¹⁵

Reactivo	Microlitros por reacción
Agua destilada	8.65
Buffer	1.25
Taq polimerasa	0.3
<i>Primers</i>	1.25

¹⁵ A esta mezcla se le agrega el control positivo, el control negativo o la muestra

Procedimiento resumido de cuantificación de ADN (método de Quantiblot)

Fijación de ADN

Use guantes durante todo el procedimiento.

1. Determine el número de muestras, incluya 7 estándares, 2 calibradores y un blanco.
2. Coloque alícuotas de la solución de manchado (150 μ l) en los tubos de reacción, según el número de muestras.
3. Utilice el cuadro guía para ubicar las muestras y rotule los tubos debidamente.
4. Agite en el Vortex todos los estándares y calibradores.
5. Agregue 5 μ l de cada solución al tubo correspondiente.
6. Repita el paso anterior con las muestras de ADN libres de MgCl₂.
7. Corte un cuadro de membrana Biodyne B de 11.0 x 7.9 cm
8. Corte un pedacito de la esquina superior derecha de la membrana para marcar la orientación.
9. Coloque la membrana en la bandeja de Hibridación, y 50 μ l de solución de remojo.
10. Incube a temperatura ambiente de 1 a 30 min.
11. Use pinzas. Coloque la membrana en el empaque del aparato de fijación y coloque la placa de montaje de muestras.
12. Encienda la fuente de vacío.
13. Apague el vacío de la muestra y deje encendido el vacío del aparato de fijación.
14. Presione sobre la placa para producir el vacío.
15. Vacíe la solución de remojo y lave la bandeja de hibridación.
16. Monte las muestras (155 μ l c/u) en el lugar correspondiente de la placa, según el cuadro.
17. Encienda el vacío de la muestra por unos 3 min.
18. Revise que en cada pozo se vea una franja de color azul.
19. Apague el vacío del aparato de fijación.
20. Desarme el aparato de fijación¹⁶ y remueva la membrana. Evite en todo momento que la membrana se seque.

Hibridación

1. Transfiera la membrana a 100 ml de la solución de hibridación (precalentada a 56 °C) en la bandeja de hibridación. Agregue 5ml de H₂O₂ al

¹⁶ El aparato de fijación debe dejarse 15 minutos en SDS al 0.1% antes de lavarse.

- 30%. Tape bien la bandeja.
2. Rote a 50 – 60 rpm en el baño a 56 °C (+/- 1 °C). por 15 minutos. Luego descarte la solución.
 3. Agregue 30 ml de solución de hibridación a la bandeja con la membrana.
 4. Agregue 20 µl de la sonda D17Z1 Quantiblot a la solución de hibridación en la bandeja. Tape la bandeja y póngala a rotar en el baño a 56 °C por 20 min. Descarte la solución.
 5. Lave la membrana ligeramente en 100 ml de solución de lavado pre-calentada. Balancee por unos segundos. Descarte la solución.
 6. Agregue 30 ml de la solución de lavado pre-calentada y 200 µl del conjugado de la sonda. Tape la bandeja. Ponga a rotar la solución a 50-60 rpm en el baño a 56 °C.
 7. Lave la membrana con 100 ml de la solución de lavado, agitando por 1 min a temperatura ambiente. Descarte la solución.
 8. Repita el paso anterior, debe agitar por 1 min, descartar la solución y luego por 15 minutos.

Desarrollo de color

9. Lave levemente en 100 ml de buffer Citrato.
10. Prepare la solución de desarrollo de color con no más de 10 minutos de anticipación.
11. Agregue en este orden a un frasco de vidrio y agite: 30 ml de buffer Citrato, 1.5 ml de la solución de cromógeno TMB y 30 µl de H₂O₂ AL 3%.
12. Agregue la solución desarrolladora de color a la membrana. Tape la bandeja. Balancee la bandeja en un rotor orbital a 50-60 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Descarte la solución.
13. Termine el desarrollo de color con 100 ml H₂O₂ desionizado. Agite por 10 minutos.
14. Repita el paso anterior tres veces.
15. Fotografíe o escanee la membrana, para guardar los resultados.

ESTADISTICA

Muestras	Extraccion	Contexto	Q2	S1	C	STR	Amel	Inhibidores de PCR	ARN [ug/ul]	Pureza (A260/A280)	Proteinas mg/ml	Moleculas/ml	230 nm	260 nm	280 nm	320nm
AF1	1	1	18	0.05	0.312	1	1	0		-	-	-	-	-	-	-
AF2	1	1	26	0.05	0.312	1	1	0		-	-	-	-	-	-	-
AF3	1	1	20	0.05	0.312	1	1	0		-	-	-	-	-	-	-
AO1	2	1	30	0.01	1.25	0	0	0	0.011	74%	0.1	5.340611E+15	0.008	0.001	-0.003	-0.013
AO2	2	1	25	0.01	0.625	0	0	1	0.010	64%	0.1	4.901769E+15	0.010	-0.003	-0.005	-0.015
AO3	2	1	35	0	5	0	0	0	0.009	100%	0.0	4.498398E+15	0.022	0.004	-0.001	-0.007
AS1	3	1	10	0.01	1.25	0	0	1	0.037	76%	0.3	1.837753E+16	0.151	0.036	0.023	-0.011
AS2	3	1	11	0.05	1.25	0	0	1	0.008	86%	0.0	3.721654E+15	0.024	0.014	0.010	0.004
AS3	3	1	10	0.05	1.25	0	0	1	0.003	70%	0.0	1.613673E+15	0.014	0.009	0.009	0.005
BF1	1	2	8	0	0.312	0	0	0	0.004	86%	0.0	1.798001E+15	0.036	0.030	0.028	0.025
BF2	1	2	8	0	1.25	0	0	0	0.000	76%	0.0	5.864161E+15	0.028	0.032	0.036	0.047
BF3	1	2	5	0	0.312	0	1	0	0.011	100%	0.0	5.377777E+15	0.080	0.054	0.047	0.040
BO1	2	2	8	0.05	1.25	0	0	0	0.011	77%	0.1	5.606065E+15	0.009	0.000	-0.004	-0.014
BO2	2	2	10	0.05	1.25	1	1	0	0.046	96%	0.2	2.296139E+16	0.109	0.079	0.055	0.021
BO3	2	2	5	0.05	1.25	1	1	0	0.014	96%	0.0	7.038234E+15	0.044	0.031	0.023	0.013
BS1	3	2	3	0.05	1.25	0	1	1	0.000	64%	0.0	1.886109E+15	0.046	0.074	0.047	0.051
BS2	3	2	30	0.01	0.312	0	0	1	0.000	75%	0.0	1.812151E+15	0.043	0.039	0.041	0.044
BS3	3	2	2	0.01	0.625	0	1	0	0.001	39%	0.0	3.128106E+14	0.034	0.025	0.026	0.025
CF1	1	2	0	0	1.25	0	0	0	0.022	87%	0.1	1.094196E+16	0.249	0.094	0.084	0.066
CF2	1	2	0	0.01	-	0	0	0	0.043	73%	0.4	2.135225E+16	0.412	0.090	0.077	0.036
CF3	1	2	3	0.01	-	0	1	0	0.019	82%	0.1	9.255459E+15	0.006	0.150	0.030	0.022
CO1	2	2	5	0.5	1.25	0	0	0	0.008	88%	0.0	4.070878E+15	0.060	0.110	0.006	0.000
CO2	2	2	6	-	0.625	0	0	1	0.023	82%	0.2	1.113006E+15	0.127	0.022	0.013	-0.006
CO3	2	2	7	0.5	0.625	0	0	0	0.004	75%	0.0	1.713855E+15	0.011	0.004	0.003	0.000
CS1	3	2	20	0.01	-	0	0	1	0.004	100%	0.0	2.012704E+15	0.039	0.033	0.031	0.028
CS2	3	2	6	0.01	-	0	0	1	0.004	100%	0.0	1.935728E+15	0.056	0.046	0.043	0.041
CS3	3	2	9	0.01	-	0	0	1	0.000	34%	0.0	3.371487E+14	0.051	0.042	0.041	0.043
DF1	1	2	9	0	1.25	0	0	0	0.009	82%	0.1	4.597071E+15	0.012	0.001	-0.003	-0.011
DF2	1	2	5	0.01	1.25	0	1	0	0.004	76%	0.0	1.922710E+15	-0.001	-0.004	-0.005	-0.009
DF3	1	2	4	0.01	1.25	0	1	0	0.009	81%	0.1	4.304637E+15	0.007	-0.001	-0.005	-0.012
DO1	2	2	3	0.01	1.25	0	0	0	0.014	72%	0.1	6.712788E+15	0.062	0.015	0.011	-0.002
DO2	2	2	16	0.05	-	0	0	0	0.012	75%	0.1	5.960571E+15	0.073	0.026	0.022	0.011
DO3	2	2	15	0.5	-	0	0	0	0.024	96%	0.1	1.179700E+15	0.134	0.082	0.069	0.052
DS1	3	2	0	0.01	0.625	0	0	1	0.012	74%	0.1	5.960948E+15	0.027	0.007	0.003	-0.008
DS2	3	2	1	0	-	0	0	1	0.010	74%	0.1	4.722913E+15	0.003	-0.002	-0.005	-0.014
DS3	3	2	25	0.01	-	0	0	1	0.022	71%	0.2	1.107685E+15	0.098	0.054	0.048	0.026
EF1	1	3	4	0.01	-	1	1	0	0.350	64%	5.1	1.730858E+17	0.288	0.437	0.038	-0.001
EF2	1	3	1	0.01	-	1	1	0	0.150	64%	2.1	7.404537E+16	0.196	0.251	0.224	0.064
EF3	1	3	1	0.01	0.625	1	1	0	0.141	65%	2.0	6.946716E+16	0.156	0.196	0.170	0.021
EO1	2	3	7	0.01	1.25	1	1	0	0.070	100%	0.2	3.798404E+16	0.039	0.094	0.043	0.028
EO2	2	3	24	0.05	0.625	1	1	0	0.002	60%	0.0	1.102195E+15	-0.011	0.004	0.004	0.002
EO3	2	3	13	-	0.625	1	1	0	0.009	100%	0.0	4.524056E+16	0.056	0.026	0.031	0.040
ES1	3	3	2	0	-	1	1	0	0.000	73%	0.0	2.997737E+15	0.057	0.056	0.058	0.063
ES2	3	3	10	0	-	1	1	0	0.000	74%	0.0	3.995977E+14	0.032	0.021	0.022	0.022
ES3	3	3	8	0	-	1	1	0	0.000	100%	0.0	8.716435E+14	0.066	0.061	0.062	0.067
FF1	1	3	42	0.01	>10	1	1	0	0.020	79%	0.2	9.650905E+15	0.057	0.067	0.060	0.043
FF2	1	3	5	0	2.5	1	1	0	0.349	71%	3.9	1.725834E+17	0.282	0.441	0.344	0.005
FF3	1	3	28	0.01	5	1	1	0	0.000	100%	0.0	5.346835E+14	0.035	0.033	0.034	0.034
FO1	2	3	258	0.05	>10	1	1	0	0.641	98%	1.9	3.170804E+17	0.478	0.870	0.521	0.068
FO2	2	3	204	0.05	>10	1	1	0	0.700	99%	1.9	3.462557E+17	0.392	0.884	0.499	0.009
FO3	2	3	107	-	>10	1	1	0	0.809	97%	2.6	3.999311E+17	0.563	0.990	0.558	-0.002
FS1	3	3	15	0	5	1	1	0	0.015	98%	0	7.630655E+15	0.098	0.083	0.074	0.063
FS2	3	3	20	0	5	1	1	0	0.007	100%	0	3.388656E+15	0.062	0.052	0.046	0.044
FS3	3	3	7	0	5	1	1	0	0.002	68%	0	1.685215E+15	0.04	0.037	0.037	0.034

Extracción * DyNa Quant 200

Cruce de DyNA Quant200 versus Extracción Count					
		Extracción			Total
		FBI	OIJ	SdC	
DyNA Quant 200	.0	2		1	3
	1.0	2		1	3
	2.0			2	2
	3.0	1	1	1	3
	4.0	2			2
	5.0	3	2		5
	6.0		1	1	2
	7.0		2	1	3
	8.0	2	1	1	4
	9.0	1		1	2
	10.0		1	3	4
	11.0			1	1
	13.0		1		1
	15.0		1	1	2
	16.0		1		1
	18.0	1			1
	20.0	1		2	3
	24.0		1		1
	25.0		1	1	2
	26.0	1			1
	28.0	1			1
	30.0		1	1	2
	35.0		1		1
42.0	1			1	
107.0		1		1	
204.0		1		1	
258.0		1		1	
Total		18	18	18	54

Extracción * DNA Strips

Cruce de DNA Strips versus Extracción Count					
		Extracción			Total
		FBI	OIJ	SdC	
DNA Strips	.0001	1			1
	.0005	1	1	3	5
	.0010	4		4	8
	.0050	5	2	5	12
	.0100	4	2	3	9
	.0500	3	7	3	13
	.5000		3		3
Total		18	15	18	51

Extracción * Quantiblot

Cruce de Quantiblot versus Extracción Count					
		Extracción			Total
		FBI	OIJ	SdC	
Quantiblot	.312	5		1	6
	.625	1	5	2	8
	1.250	5	7	4	16
	2.500	1			1
	5.000	1	1	3	5
	10.000	1	3		4
Total		14	16	10	40

Extracción * Pureza (A260/A280)

Cruce de Pureza versus Extracción					
Count					
	Extracción			Total	
	FBI	OIJ	SdC		
	34		1	1	
	39		1	1	
	60	1		1	
	64	2	1	4	
	65	1		1	
	68		1	1	
	70		1	1	
	71	1	1	2	
	72		1	1	
	73	1	1	2	
	74		1	3	
	75		2	3	
Pureza (%) (A260/A280)	76	2		1	3
	77		1		1
	79	1			1
	81	1			1
	82	2	1		3
	86	1		1	2
	87	1			1
	88		1		1
	96		3		3
	97		1		1
	98		1	1	2
	99		1		1
	100	2	3	4	9
Total		15	18	18	51

Extracción * Proteínas mg/ml

Cruce de Proteínas versus Extracción					
Count					
		Extracción			Total
		FBI	OIJ	SdC	
Proteínas mg/ml	.00	5	6	14	25
	.10	4	6	2	12
	.20	1	3	1	5
	.30			1	1
	.40	1			1
	1.90		2		2
	2.00	1			1
	2.10	1			1
	2.60		1		1
	3.90	1			1
	5.10	1			1
Total		15	18	18	51

Extracción * ARN[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]

Cruce de ARN versus Extracción					
Count					
		Extracción			Total
		FBI	OIJ	SdC	
ARN[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	.000	2		6	8
	.001			1	1
	.002		1	1	2
	.003			1	1
	.004		1		1
	.004	1			1
	.004	1		1	2
	.004			1	1
	.007			1	1
	.008			1	1
	.008		1		1
	.009	1			1
	.009		2		2
	.009	1			1
	.010			1	1
	.010		1		1
	.011		1		1
	.011	1			1
	.011		1		1
	.012		1	1	2
	.014		1		1
	.014		1		1
	.015			1	1
	.019	1			1
	.020	1			1
	.022	1			1
	.022			1	1
	.023		1		1
	.024		1		1
	.037			1	1
.043	1			1	
.046		1		1	

	.070		1		1
	.141	1			1
	.150	1			1
	.349	1			1
	.350	1			1
	.641		1		1
	.700		1		1
	.809		1		1
Total		15	18	18	51

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Extracción	N	Mean Rank
DyNA Quant 200	FBI	18	22.25
	OIJ	18	34.28
	SdC	18	25.97
	Total	54	
DNA Strips	FBI	18	22.19
	OIJ	15	36.73
	SdC	18	20.86
	Total	51	
ARN[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	FBI	15	29.83
	OIJ	18	32.33
	SdC	18	16.47
	Total	51	
Proteínas mg/ml	FBI	15	31.40
	OIJ	18	29.28
	SdC	18	18.22
	Total	51	

Test Statistics(a,b)			
	Chi-Square	df	Asymp. Sig.
DyNA Quant 200	5.529	2	.063
DNA Strips	11.611	2	.003
ARN[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	11.705	2	.003
Proteínas mg/ml	8.960	2	.011
a Kruskal Wallis Test			
b Grouping Variable: Extracción			

Median Test

Frequencies				
		Extracción		
		FBI	OIJ	SdC
DyNA Quant 200	> Median	6	11	10
	<= Median	12	7	8
DNA Strips	> Median	7	12	6
	<= Median	11	3	12
ARN[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	> Median	9	12	4
	<= Median	6	6	14
Proteínas mg/ml	> Median	6	6	2
	<= Median	9	12	16

Extracción * STR's

Cruce de STR's versus Extracción					
			STR's		Total
			NO	SI	
Extracción	FBI	Count	9	9	18
		% within Extracción	50.0%	50.0%	100.0%
		% within STR's	29.0%	39.1%	33.3%
	OIJ	Count	10	8	18
		% within Extracción	55.6%	44.4%	100.0%
		% within STR's	32.3%	34.8%	33.3%
	SdC	Count	12	6	18
		% within Extracción	66.7%	33.3%	100.0%
		% within STR's	38.7%	26.1%	33.3%
Total	Count	31	23	54	
	% within Extracción	57.4%	42.6%	100.0%	
	% within STR's	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.060(a)	2	.589
Likelihood Ratio	1.072	2	.585
Linear-by-Linear Association	1.004	1	.316
N of Valid Cases	54		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.67.

Extracción * Amelogenina

Cruce de Amelogenina versus Extracción					
			Amelogenina		Total
			NO	SI	
Extracción	FBI	Count	5	13	18
		% within Extracción	27.8%	72.2%	100.0%
		% within Amelogenina	20.0%	44.8%	33.3%
	OIJ	Count	10	8	18
		% within Extracción	55.6%	44.4%	100.0%
		% within Amelogenina	40.0%	27.6%	33.3%
	SdC	Count	10	8	18
		% within Extracción	55.6%	44.4%	100.0%
		% within Amelogenina	40.0%	27.6%	33.3%
Total	Count	25	29	54	
	% within Extracción	46.3%	53.7%	100.0%	
	% within Amelogenina	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3.724(a)	2	.155
Likelihood Ratio	3.832	2	.147
Linear-by-Linear Association	2.741	1	.098
N of Valid Cases	54		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8.33.

Extracción * Inhibidores de PCR

Cruce de Inhibidores de PCR versus Extracción					
			Inhibidores de PCR		Total
			NO	SI	
Extracción	FBI	Count	18		18
		% within Extracción	100.0%		100.0%
		% within Inhibidores de PCR	43.9%		33.3%
	OIJ	Count	16	2	18
		% within Extracción	88.9%	11.1%	100.0%
		% within Inhibidores de PCR	39.0%	15.4%	33.3%
	SdC	Count	7	11	18
		% within Extracción	38.9%	61.1%	100.0%
		% within Inhibidores de PCR	17.1%	84.6%	33.3%
Total	Count	41	13	54	
	% within Extracción	75.9%	24.1%	100.0%	
	% within Inhibidores de PCR	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	20.871(a)	2	.000
Likelihood Ratio	22.994	2	.000
Linear-by-Linear Association	18.048	1	.000
N of Valid Cases	54		
a 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.33.			

Contexto * STR's

Cruce de STR's versus Contexto					
			STR's		Total
			NO	SI	
Contexto	EXHUMADO	Count	6	3	9
		% within Contexto	66.7%	33.3%	100.0%
		% within STR's	19.4%	13.0%	16.7%
	ACUATICO	Count	25	2	27
		% within Contexto	92.6%	7.4%	100.0%
		% within STR's	80.6%	8.7%	50.0%
	OTRO	Count		18	18
		% within Contexto		100.0%	100.0%
		% within STR's		78.3%	33.3%
Total	Count	31	23	54	
	% within Contexto	57.4%	42.6%	100.0%	
	% within STR's	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	38.247(a)	2	.000
Likelihood Ratio	47.954	2	.000
Linear-by-Linear Association	19.628	1	.000
N of Valid Cases	54		

a 1 cells (16.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.83.

Contexto * Amelogenina

Cruce de Amelogenina versus Contexto					
			Amelogenina		Total
			NO	SI	
Contexto	EXHUMADO	Count	6	3	9
		% within Contexto	66.7%	33.3%	100.0%
		% within Amelogenina	24.0%	10.3%	16.7%
	ACUATICO	Count	19	8	27
		% within Contexto	70.4%	29.6%	100.0%
		% within Amelogenina	76.0%	27.6%	50.0%
	OTRO	Count		18	18
		% within Contexto		100.0%	100.0%
		% within Amelogenina		62.1%	33.3%
Total		Count	25	29	54
		% within Contexto	46.3%	53.7%	100.0%
		% within Amelogenina	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	23.313(a)	2	.000
Likelihood Ratio	30.291	2	.000
Linear-by-Linear Association	16.001	1	.000
N of Valid Cases	54		

a 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.17.

Contexto * Inhibidores de PCR

Cruce de Inhibidores de PCR versus Contexto					
			Inhibidores de PCR		Total
			NO	SI	
Contexto	EXHUMADO	Count	5	4	9
		% within Contexto	55.6%	44.4%	100.0%
		% within Inhibidores de PCR	12.2%	30.8%	16.7%
	ACUATICO	Count	18	9	27
		% within Contexto	66.7%	33.3%	100.0%
		% within Inhibidores de PCR	43.9%	69.2%	50.0%
	OTRO	Count	18		18
		% within Contexto	100.0%		100.0%
		% within Inhibidores de PCR	43.9%		33.3%
Total	Count	41	13	54	
	% within Contexto	75.9%	24.1%	100.0%	
	% within Inhibidores de PCR	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	9.017(a)	2	.011
Likelihood Ratio	12.872	2	.002
Linear-by-Linear Association	8.008	1	.005
N of Valid Cases	54		

a 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.17.

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Quantiblot	FBI	14	1.85250	2.658734	.710577	.31739	3.38761	.312	10.000
	OIJ	16	2.92969	3.656606	.914152	.98122	4.87816	.625	10.000
	SdC	10	2.15620	1.989880	.629255	.73273	3.57967	.312	5.000
	Total	40	2.35930	2.940902	.464997	1.41875	3.29985	.312	10.000
Pureza (A260/A280)	FBI	15	79.07	11.279	2.912	72.82	85.31	64	100
	OIJ	18	86.06	13.645	3.216	79.27	92.84	60	100
	SdC	18	76.44	19.264	4.540	66.86	86.02	34	100
	Total	51	80.61	15.580	2.182	76.23	84.99	34	100
DyNa Quant 200	FBI	18	10.389	11.7129	2.7608	4.564	16.214	.0	42.0
	OIJ	18	43.222	72.8960	17.1818	6.972	79.473	3.0	258.0
	SdC	18	10.500	8.5216	2.0086	6.262	14.738	.0	30.0
	Total	54	21.370	44.8887	6.1086	9.118	33.623	.0	258.0
DNA Strips	FBI	18	.012200	.0177402	.0041814	.003378	.021022	.0001	.0500
	OIJ	15	.125367	.1949356	.0503321	.017415	.233318	.0005	.5000
	SdC	18	.011694	.0179346	.0042272	.002776	.020613	.0005	.0500
	Total	51	.045306	.1165354	.0163182	.012530	.078082	.0001	.5000
ARN[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	FBI	15	.075267	.1209484	.0312287	.008288	.142246	.0000	.3500
	OIJ	18	.134256	.2700541	.0636524	.000039	.268550	.0022	.8086
	SdC	18	.006950	.0098278	.0023164	.002063	.011837	.0000	.0372
	Total	51	.071975	.1784561	.0249889	.021783	.122166	.0000	.8086
Proteínas mg/ml	FBI	15	.9400	1.61723	.41757	.0444	1.8356	.00	5.10
	OIJ	18	.4222	.80261	.18918	.0231	.8214	.00	2.60
	SdC	18	.0389	.08498	.02003	-.0034	.0812	.00	.30
	Total	51	.4392	1.04251	.14598	.1460	.7324	.00	5.10

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Quantiblot	Between Groups	9.214	2	4.607	.520	.599
	Within Groups	328.093	37	8.867		
	Total	337.307	39			
Pureza (A260/A280)	Between Groups	881.835	2	440.917	1.881	.164
	Within Groups	11254.322	48	234.465		
	Total	12136.157	50			

Ratio Statistics

Ratio Statistics for 260 nm / 230 nm						
Group	Mean	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Coefficient of Concentration
		Lower Bound	Upper Bound			Percent between 0 and 1.99 inclusive
FBI	2.774	-1.271	6.820	.083	25.000	92.3%
OIJ	.772	.342	1.203	.000	2.410	87.5%
SdC	.776	.619	.933	.238	1.609	100.0%
Overall	1.339	.267	2.411	.000	25.000	93.5%

The confidence intervals are constructed by assuming a Normal distribution for the ratios.

Ratio Statistics for 260 nm / 280 nm						
Group	Mean	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Coefficient of Concentration
		Lower Bound	Upper Bound			Percent between 0 and 1.69 inclusive
FBI	2.303	.311	4.294	.889	11.592	83.3%
OIJ	1.461	1.255	1.667	.839	2.186	71.4%
SdC	1.190	1.006	1.373	.951	2.333	94.1%
Overall	1.589	1.067	2.110	.839	11.592	83.7%

The confidence intervals are constructed by assuming a Normal distribution for the ratios.

Ratio Statistics for 260 nm / 230 nm						
Group	Mean	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Coefficient of Concentration
		Lower Bound	Upper Bound			Percent between 0 and 1.99 inclusive
EXHUMADO	.354	.056	.653	.125	.643	100.0%
ACUATICO	1.593	-.518	3.704	.000	25.000	95.8%
OTRO	1.272	.990	1.553	.464	2.410	88.2%
Overall	1.339	.267	2.411	.000	25.000	93.5%
The confidence intervals are constructed by assuming a Normal distribution for the ratios.						

Ratio Statistics for 260 nm / 280 nm						
Group	Mean	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Coefficient of Concentration
		Lower Bound	Upper Bound			Percent between 0 and 1.69 inclusive
EXHUMADO	1.322	.600	2.044	1.000	1.565	100.0%
ACUATICO	1.441	1.061	1.822	.889	5.000	86.4%
OTRO	1.813	.586	3.040	.839	11.592	77.8%
Overall	1.589	1.067	2.110	.839	11.592	83.7%
The confidence intervals are constructed by assuming a Normal distribution for the ratios.						