



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y
PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS ÓSEOS PARA
ANÁLISIS FORENSE.**

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

Adriana Capó Jiménez

CARTAGO, 2009

COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS ÓSEOS PARA ANÁLISIS FORENSE

Adriana Capó Jiménez¹

RESUMEN

La extracción de ADN a partir de hueso implica la utilización de metodologías complejas debido a problemas como la degradación, las cantidades limitantes de ADN y la presencia de sustancias inhibidoras que pueden ser co-extraídas con el ADN. En el Laboratorio de Genética Forense del OIJ se ha dificultado la estandarización de un protocolo útil para extracción y análisis de ADN de alta calidad y cantidad. Con el fin de encontrar un método que proporcione las mejores condiciones de extracción, purificación y amplificación de ADN, se realizó la comparación de tres metodologías de extracción de ADN a partir de restos óseos, entre ellas el método de desmineralización, el método orgánico utilizado actualmente en el laboratorio, procedente del FBI y el Kit comercial Qiagen Blood Maxi Kit. También se efectuó la comparación de técnicas de purificación adicionales en los protocolos de desmineralización y FBI. La desmineralización mostró ser un método prometedor para la extracción y amplificación de ADN de restos óseos presentado los mejores resultados de cuantificación; mientras que las columnas Centricon® YM-50 mostraron las mejores condiciones para la concentración y purificación de ADN. En el método del FBI es más recomendable realizar la purificación de los extractos con dispositivos de ultrafiltración Centricon® YM-100. Mediante este trabajo se demostró que el método de extracción, así como el diámetro de poro de las columnas de purificación y el fundamento de filtración son factores determinantes en el éxito del proceso.

Palabras clave: desmineralización, Qiagen Blood Maxi Kit, tejido óseo.

¹ INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2008.

ABSTRACT

The DNA extraction from bone implies the use of complex methodologies due to problems like the degradation, the amounts DNA obstacles and the presence of inhibiting substances that can Co-beextracted with the DNA. In the Laboratory of Forensic Genetics of the OIJ one has become difficult to the standardization of a useful protocol for extraction and DNA analysis of high quality and amount. With the purpose to find a method that provides the best conditions of DNA purification, extraction and amplification, the comparison of three methodologies of DNA extraction was realised from bony rest, among them the method of demineralization, the used organic method at the moment in the laboratory, coming from the FBI and the commercial Kit Qiagen Blood Maxi Kit. Also one took place the comparison of additional techniques of purification in the protocols of demineralization and FBI. The demineralization showed to be a promising method for the extraction and to DNA amplification of bony rest presented/displayed the best results of quantification; whereas the columns Centricon® YM-50 showed to the best conditions for the concentration and DNA purification. In the method of the FBI he is more recommendable to realise the purification of the extracts with devices of ultrafiltration Centricon® YM-100. By means of this work one demonstrated that the extraction methods, as well as the diameter of pore of the purification columns and the foundation of filtration are determining factors in the success of the process.

Key Words: demineralization, Qiagen Blood Maxi Kit, bone tissue.

DEDICATORIA

A mi madre por ser el motivo, la razón y el mayor apoyo que he tenido para cada una de las metas que he trazado en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Espinoza Esquivel, por haberme brindado la gran oportunidad de realizar mi práctica profesional en esta institución, así mismo por el apoyo financiero y logístico.

A todo el equipo del Laboratorio de Genética Forense del OIJ, muy especialmente a: Anayanci Rodríguez, Ingrid Sanoú, Gladys Núñez, Glen Arrieta, Rebeca Flores; que sabiamente me han instruido en los aspectos técnicos de esta tesis y a Anayanci Morales por su colaboración en la cuantificación de las muestras por PCR en Tiempo Real.

A Odille Loreille, científico investigador en el tema de la desmineralización ósea por todas sus sugerencias para la implementación de éste protocolo.

A Nuria Figueroa por infundirme ánimos y por su amistad.

Finalmente quisiera agradecer a aquellas personas que han permanecido a mi lado durante mis estudios apoyándome y animándome:

A mis hermanas Rita, Susana, Montse, mis tesoros Luna y Abril por darme fuerzas y amor durante estos 25 años de vida.

A Pablo por creer en mí siempre, por todo su amor y por ayudarme a cumplir esta meta.

A Doña Carmen Monge Chavarría y Don Manuel Soto Calderón por todo su cariño y apoyo.

A mi nueva familia Anny Watson Céspedes, Julio Cesar Guillén Martínez, Anny y Cesar por toda su ayuda y cariño para lograr éste propósito y muy especialmente a Rossy por convertirse en mi mejor amiga y confidente; por compartir conmigo la tristeza y la alegría.

A los miembros del tribunal evaluador, por su valiosa guía, por todos sus consejos, dedicación y aportes para la realización de este trabajo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
DEDICATORIA	3
INDICE GENERAL	5
INDICE DE CUADROS	7
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE ANEXOS	11
INTRODUCCIÓN	12
REVISIÓN DE LITERATURA	16
TEJIDOS ÓSEOS COMO FUENTE DE ADN.....	16
EXTRACCIÓN DE ADN.....	18
CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN	19
CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS POR PCR EN TIEMPO REAL.....	20
ANÁLISIS DE STRs CON ELECTROFORESIS CAPILAR	21
POLIMORFISMOS ANALIZADOS EN GENÉTICA FORENSE	22
PROBLEMÁTICA ASOCIADA AL ANÁLISIS DE TEJIDOS ÓSEOS	25
OBJETIVOS	31
General.....	31
Específicos	31
MATERIALES Y METODOS	32
1. Selección de muestras	32
2. Pulverización de las muestras	32
3. Extracción de ADN.....	34
4. Cuantificación de secuencias específicas de ADN mediante PCR en Tiempo Real. ..	37
5. PCR Múltiple y Obtención del perfil genético.	38
6. Análisis estadístico.	39

RESULTADOS	40
Pulverización y Extracción de ADN de tejido óseo.....	40
Comparación de tres métodos de extracción de ADN	41
Comparación de tres métodos de purificación y concentración del ADN a los extractos obtenidos con el protocolo del FBI.....	44
Comparación de tres métodos de purificación y concentración del ADN a los extractos obtenidos con el protocolo de desmineralización	1
DISCUSIÓN	4
CONCLUSIONES	13
RECOMENDACIONES.....	14
BIBLIOGRAFÍA	16
ANEXOS	20

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1.	Rotulación de muestras de restos óseos analizadas.	32
2.	Resumen de procesos de extracción y purificación aplicados en cada metodología.....	37
3.	Descripción de la región de ADN humano de interés en la cuantificación.	38
4.	Concentración de reactivos utilizados para la amplificación de muestras óseas con el kit Identifiler™ de Applied Biosystems®.	38
5.	Ciclaje utilizado con el Kit Identifiler™.	39
6.	Resultados de cuantificación por PCR Tiempo Real del ADN e inhibidores y resultados de PCR obtenidos a partir de extractos de ADN procedentes de restos óseos; mediante la aplicación de tres metodologías diferentes. Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008.	41
7.	Resultados de cuantificación por PCR Tiempo Real del ADN e inhibidores y resultados de PCR obtenidos con el método del FBI y la posterior purificación mediante la aplicación de tres metodologías diferentes. Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008.	44
8.	Resultados de cuantificación por PCR Tiempo Real del ADN e inhibidores y resultados de PCR obtenidos con el método de desmineralización y la posterior purificación mediante la aplicación de tres metodologías diferentes. Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008.	1
9.	Descripción de la PCR mediante la utilización del Kit comercial identifiler™.	22
10.	Resumen de análisis de varianza de la cuantificación de ADN de 11 muestras de tejido óseo mediante la aplicación de tres metodologías de extracción de ADN.	26
11.	Resumen de análisis de varianza de la cuantificación de ADN de 11 muestras de tejido óseo mediante la aplicación de tres metodologías de purificación de ADN en el protocolo de desmineralización.....	26

12. Resumen de análisis de varianza de la cuantificación de ADN de 6 muestras de tejido óseo mediante la aplicación de tres metodologías de purificación de ADN en el protocolo del FBI.26

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1.	Rendimientos obtenidos en la extracción de ADN por el FBI en el análisis forense de diferentes muestras del esqueleto humano.....	17
2.	Fundamento sobre el cual funcionan las columnas de purificación de ADN	20
3.	Pasos para la detección de STRs en la identificación de muestras biológicas de procedencia humana	22
4.	Viales de polipropileno que contienen hueso pulverizado.	33
5.	A) Apariencia física de muestras óseas pulverizadas (previo al análisis), B) color marrón presente en extractos de ADN (I-06-063).....	40
6.	Comparación de la cuantificación de ADN obtenida por tres metodologías diferentes.	42
7.	Comparación del porcentaje de muestras con presencia de inhibidores en tres metodologías diferentes de extracción de ADN.	42
8.	Comparación del porcentaje de amplificación de STRs en tres metodologías distintas de extracción de ADN.	43
9.	Resultados de medias de cuantificación obtenidas mediante la aplicación de tres metodologías de purificación de ADN.	45
10.	Comparación de inhibidores presentes en tres métodos de purificación de ADN en extractos del FBI.	45
11.	Resultados de amplificación de STRs mediante la aplicación de tres métodos de purificación diferentes en extractos del FBI	46
12.	Resultados de cuantificación de ADN mediante tres metodologías de purificación de ADN en el protocolo de desmineralización.	2
13.	Eficiencia en la purificación de ADN mostrada por tres columnas distintas en extractos realizados con la metodología de desmineralización.....	2

14. Resultados de amplificación de STRs mediante la aplicación de tres métodos de purificación diferentes de extractos realizados mediante la técnica de desmineralización ...	3
15. Evolución del proceso de desmineralización.....	6
16. A. Diagrama de Centricon® YM-100 y YM- 50 y B. diagrama de Amicon® Ultra-4	21
17. Representación esquemática del proceso de PCR Tiempo Real.....	22
18. Fragmentos de hueso listos para pulverizar.....	24
19. Representación esquemática para la aplicación del Kit de QIAGEN.....	25
20. Masa retenida (%) en función del tiempo de desmineralización.....	28
21. Influencia del volumen de la solución de lavado en el proceso de desmineralización..	28

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1.	Entidades Internacionales participantes en el estudio del tema de la extracción de ADN de restos óseos por el laboratorio SWGDAM del FBI ADN U II, 2501 Investigación Parkway, Quantico, VA 22135:.....	20
2.	Representación esquemática de columnas Centricon® y Amicon® Ultra-4.....	20
3.	Representación esquemática de un ensayo RT-PCR usando el método Taqman®.....	22
4.	PCR mediante el Kit AmpFISTR® Identifiler™.....	22
5.	Corte de fragmentos de hueso realizado previo a la a la trituración.....	24
6.	Modificaciones realizadas al proceso de desmineralización.....	24
7.	Diagrama de aplicación del KIT de QIAGEN.....	25
8.	Estadística.....	26
9.	Alcances del analizador genético ABI Prism 3130®.....	26
10.	Proceso mediante el cuál a medida que la fase mineral del hueso disminuye, el porcentaje de masa retenida por la hidroxapatita se reduce.....	28
11.	Proceso de desmineralización en función del volumen de solución ácida utilizada.....	28

INTRODUCCIÓN

Actualmente la pericia genética realizada sobre restos biológicos es una actividad rutinaria en el entorno forense. El análisis de muestras involucradas en ciertos delitos puede ayudar a esclarecer cómo ocurrieron los hechos o quienes intervinieron en los mismos. De la misma forma, la aplicación de técnicas moleculares en la identificación de cadáveres ha permitido resolver aquellos casos que no podían solventarse mediante técnicas clásicas de identificación (huella dactilar, ficha dental, entre otros).

Los tipos de muestras dubitadas o evidencias (restos biológicos de procedencia desconocida) más frecuentemente analizadas por técnicas genético moleculares son sangre (habitualmente en forma de mancha), semen (aplicadores vaginales o manchas sobre prendas de la víctima), saliva (colillas de cigarrillo, chicles, sobres y sellos), pelos, uñas, tejidos blandos, restos óseos y dentarios (estos últimos relacionados fundamentalmente con la identificación de cadáveres).

Aunque se espera que el ADN sea idéntico en todas las células del cuerpo, su estabilidad postmortem difiere significativamente de un tejido a otro. El ADN se degrada rápidamente en tejidos blandos de cuerpos en descomposición, debido a la acción de enzimas endógenas, agentes exógenos, además del daño provocado por las condiciones ambientales a las que el organismo haya estado expuesto. Sin embargo la protección del medio externo que la matriz ósea brinda al ADN hace del hueso el último recurso para obtener información genética cuando el resto de tejidos son inútiles para este fin; pero a la vez el hueso y los dientes presentan la forma de preservación más importante del ADN, debido a que la molécula queda comprimida entre los cristales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) los cuales tienen una alta afinidad por el ADN y lo estabilizan, además la actividad de agua y de enzimas degradantes que contiene el hueso son relativamente pocas, y el tejido óseo actúa como una barrera física a factores externos tales como la luz UV y los microorganismos (Arroyo *et al*, 2003).

De todos los tipos de muestras analizadas en genética forense, los cadáveres ya esqueletizados en los que la única muestra disponible son huesos y dientes constituyen los

más problemáticos en cuanto a su identificación genética (Martín, 2007). Cuando se recurre al análisis de restos óseos implica que se ha eliminado cualquier otra posibilidad de obtención de ADN; debido a que el proceso de extracción de ADN del hueso es siempre complicado y a veces infructuoso (restos óseos con alto grado de descomposición, procedentes de exhumaciones, restos antiguos, entre otros), aunque las condiciones sean adversas, ni siquiera el ADN atrincherado en el hueso es inmune a la degradación.

Si bien sabemos de partida que el ADN de tejido óseo será escaso y degradado, la elección del método de extracción será crucial, y a menudo supone un compromiso entre calidad y cantidad.

El procesado previo a la extracción de ADN en los restos óseos debe comenzar siempre con la limpieza del espécimen, para liberarlo de cualquier resto de tejido blando y descontaminarlo, posteriormente se debe de efectuar la extracción del ADN, con el fin de separarlo del resto de componentes celulares. Se trata de un paso fundamental, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de la molécula.

Consecutivamente para tratar de comprobar la fiabilidad de la información genética recuperada a partir de las muestras óseas, se estima el número de moléculas de ADN nuclear presentes en los extractos mediante cuantificación absoluta por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en Tiempo Real, lo cual proporciona especial ayuda a la hora de analizar huesos en los que el número de copias disponible para iniciar la reacción es muy bajo, o cuando el ADN se encuentra muy degradado. A la vez mediante este análisis se establece la presencia y cantidad de inhibidores en los extractos, lo que determina la eficiencia en la amplificación y en los estudios posteriores a los que se someterán las muestras.

Para determinar a que individuo pertenece una muestra biológica se recurre al estudio de parte de su ADN, a pesar de que en una primera fase se aísla la molécula completa, posteriormente sólo se estudia ciertas regiones de ella, concretamente las zonas más polimórficas. Una clase importante del ADN repetitivo es el ADN microsatélite o STRs

(repeticiones cortas en tandem) formado por secuencias pequeñas de hasta 400 pb que las hace ideales para que puedan ser detectadas mediante la amplificación por PCR. Los alelos de los loci STRs pueden diferenciarse por el número de copias de la secuencia repetida presente en una región amplificada y se distinguen de otros segmentos del ADN utilizando para ello detección radiactiva, o fluorescente después de la separación electroforética. Esta es la fase final del análisis molecular y es la que nos permite caracterizar y clasificar los fragmentos de ADN estudiados en cada muestra, para a partir de esto diferenciar individuos (Lorente et al, 2007).

La extracción de ADN a partir de tejido óseo y dentario en el Laboratorio de Genética Forense del Organismo de Investigación Judicial (OIJ) es la más larga y susceptible a problemas como la degradación, contaminación, entre otros; lo que ha dificultado estandarizar éste protocolo para obtener alta calidad y cantidad de ADN que sea reproducible a muestras con diferentes procedencias.

Por esta razón y de acuerdo a un estudio efectuado por el laboratorio SWGDAM del FBI en abril del 2005, en el cual se realizó un análisis de los protocolos empleados para obtener ADN a partir de restos óseos en entidades forenses alrededor del mundo (en el anexo 1 se muestran los países participantes en este estudio); el laboratorio de Ciencias Forenses en Costa Rica no obtuvo resultados positivos en el 100 % de los casos, de la misma forma las técnicas empleadas para realizar este análisis varían con respecto a las utilizadas en el laboratorio de Ciencias Forenses en Costa Rica. En este trabajo se realizó la comparación de tres metodologías para la extracción de ADN; dos metodologías de extracción orgánicas como la del FBI (empleada actualmente en el laboratorio) y la de desmineralización (publicado en el año 2007 y aplicado por entidades como “Internacional Comisión on Missing Persons”, Alipasina, Sarajevo, Bosnia Herzegovina y “American Registry of Pathology of U.S”) (Loreille *et al* , 2007), así como un método no orgánico basado en el aislamiento de ADN total de huesos y dientes de la casa comercial QIAGEN®.

Para la purificación del ADN se utilizaron los protocolos ya establecidos en cada metodología como por ejemplo en el FBI columnas de Centricon® YM-100, en desmineralización columnas Centricon® YM-50 y en el Kit de QIAGEN® las columnas

QIAamp. Por otro lado en las dos primeras metodologías se probaron técnicas de purificación y concentración de ADN adicionales para comparar su efectividad en la concentración de ADN y en la eliminación de contaminantes e inhibidores.

Este trabajo se realizó con el fin de seleccionar el protocolo del cual se pueda extraer mayor calidad y cantidad de ADN amplificable para realizar con éxito los análisis posteriores a la extracción. Además también se pretendió evidenciar las debilidades y fortalezas del protocolo de extracción utilizado actualmente por el Laboratorio de Genética Forense.

REVISIÓN DE LITERATURA

TEJIDOS ÓSEOS COMO FUENTE DE ADN

El tejido óseo se compone fundamentalmente de una matriz orgánica calcificada impregnada de sales minerales, con una alta concentración de fibras de colágeno que representa aproximadamente un 95% del peso de la matriz orgánica del hueso. En cuanto a las sales minerales éstas se encuentran en forma de fosfato de calcio y cristales de hidroxapatita. Esta matriz está recorrida por un sistema de cavidades lagunas o osteoplastos que se comunican entre sí y que encierran las células óseas (osteocitos) y por los canalículos óseos. Una característica interesante es que en los espacios intercelulares apenas hay líquido intersticial, con lo que la cantidad de agua en el tejido óseo es muy baja. Las células que componen el tejido óseo son los osteoblastos, que al rodearse de la matriz y madurar se denominan osteocitos y osteoclastos (Martín, 2007).

Según estadísticas del FBI del año 2004 con respecto al rendimiento que han mostrado diferentes muestras del esqueleto humano en el análisis genético, los huesos craneales presentan un rendimiento del 50 %, la mandíbula y la escápula del 70%, mientras que el húmero y fémur presentan rendimientos del 80% y 90%, por lo que se considera que estos últimos son más aptos para el análisis forense (Figura 2) (Edson *et al*, 2004). Lo anterior se debe a que son huesos largos de modo que brindan suficiente material para el análisis, especialmente en la identificación de restos de niños. Este tipo de huesos presentan un cilindro de pared gruesa con consistencia compacta, una cavidad central voluminosa, ocupada por médula ósea con función de envolver los elementos formadores de la sangre misma, también posee características como alta resistencia a la degradación. El hueso compacto carece de porosidades visibles a simple vista, de esta manera las estructuras más externas brindan protección a las células más internas (como las osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), las cuales son de interés en el análisis molecular porque contienen ADN.

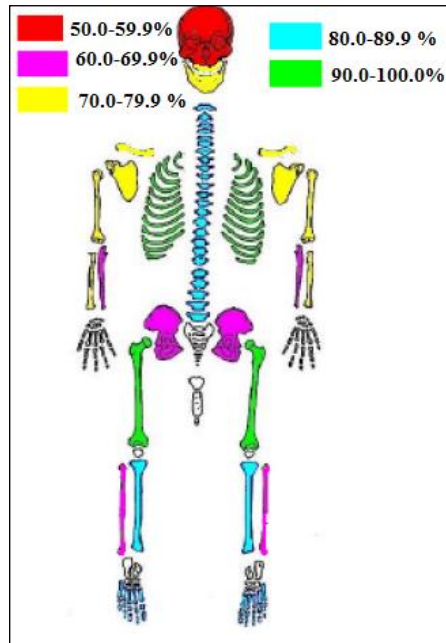


Figura 1. Rendimientos obtenidos en la extracción de ADN por el FBI en el análisis forense de diferentes muestras del esqueleto humano.

Fuente: Edson *et al*, 2004.

El sistema Haversiano u osteonas, las cuales tienen una función vascular (donde es posible encontrar células nucleadas) 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 (Frías *et al*, 2008).

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, 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. 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 y en otros huesos más pequeños. Todas estas características, refuerzan la elección del fémur y el húmero como los huesos más aptos 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 (Del Valle, 2002)

EXTRACCIÓN DE ADN

La elección del método de extracción será crucial, y a menudo supone un compromiso entre cantidad y calidad del ADN extraído. En la actualidad se hallan varios protocolos para la extracción de ADN a partir de tejido óseo, entre los cuales se distinguen el método de silica, la extracción orgánica, Kits comerciales, el procedimiento de chelex, un método prometedor basado en el lavado del ADN con columnas de hidroxiapatita por incubación en altas concentraciones de fosfato de sodio, el método estándar con descalcificación y sin descalcificación previa del tejido óseo (Arroyo *et al*, 2003) y la técnica de desmineralización, la cual es resultado de la innovación en la descalcificación (Loreille *et al*, 2007).

El método de extracción de ADN mas utilizado en este tipo de muestras forenses consiste en una digestión proteica, seguida de una extracción orgánica de ADN mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La técnica requiere de la adicción de reactivos como Proteinasa K para lisar las células y remover las proteínas que protegen el ADN como las histonas cuya función es empaquetar el ADN para que adquiera la forma de cromosoma (Del Valle, 2002). El fenol se mezcla con el sobrenadante resultante de la lisis (fase acuosa) y desnatura las proteínas de la muestra, que pasan a la fase fenólica mientras que los ácidos nucleicos permanecen solubles en la fase acuosa, el cloroformo disuelve los lípidos, mejora la eficiencia de las extracciones debido a su capacidad para desnaturar proteínas y para eliminar posibles restos de fenol en la fase acuosa, la diferente densidad de las fases acuosa y orgánica (fenol y cloroformo) permite su separación por centrifugación de una manera fácil y rápida (Fernández, 2000).

En la desmineralización se utiliza el EDTA como un potente secuestrador del calcio. Algunas de las razones para la utilización del EDTA son: a) la desintegración de la matriz ósea debido a que el polvo de hueso al ser muy grande en escala celular evita que haya eficiente contacto de los componentes del buffer con la célula y consecuentemente se de una extracción de ADN de manera eficiente b) la doble hebra de ADN tiene fuerte afinidad por la hidroxiapatita, la cual mediante el uso de este compuesto puede ser removida para recuperar el ADN inmerso en ella c) el EDTA disminuye compuestos contaminantes en el

extracto que tienden a precipitar con el ADN y causar la inhibición de la PCR (Jiménez & Morera, 2007).

CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

En genética forense existen diferentes métodos para concentrar y purificar el ADN como la cromatografía de permeabilidad o de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de adsorción (en sílice) y la ultrafiltración. Este proceso permite eliminar los agentes contaminantes del extracto como por ejemplo las sales, las cuales dificultan la disolución del ADN, pueden inhibir las reacciones enzimáticas posteriores y permite a su vez reducir el volumen de la muestra aumentando la concentración del ADN (Frías *et al.*, 2008).

El procedimiento más utilizado para ejecutar este proceso se basa en la ultrafiltración mediante microconcentradores como Centricon® YM-100 y 50, Amicon® Ultra-4 y columnas de QIAamp®, entre otros. Cada microcentrador consta de un compartimiento en el que se deposita el extracto de ADN, una membrana de filtración en la parte inferior de cada columna y para recoger el volumen no filtrado con las columnas existe un tercer depósito que puede acoplarse a la parte superior del compartimiento central (excepto Amicon® Ultra-4, el cual trae adaptado todos los dispositivos)² (ver anexo 2 diagrama de columnas).

Con estos dispositivos la concentración se produce por ultrafiltración de la solución a través de una membrana anisotrópica de tipo YM hidrofílica y de baja absorción con un tamaño de poro de 100.000 Daltons (Centricon® YM-100 y Amicon® Ultra-4) y 50.000 Daltons (Centricon® YM-50). La fuerza centrífuga actúa sobre la superficie de la membrana en un ángulo fijo de manera que los solutos de bajo peso molecular contenidos en el extracto pueden traspasarla mientras que aquellos de diámetro superior al del poro quedan retenidos (figura 3). Los solutos que van siendo retenidos durante el proceso se depositan en los márgenes de la membrana de manera que no obstruyan el filtro; por lo

² MILIPORE. 2000. CENTRICON® Centrifugal Filter Devices

tanto el poder de filtración de éste dispositivo se mantiene teóricamente durante todo el proceso de filtrado, o disminuye ligeramente (Fernández, 2000).

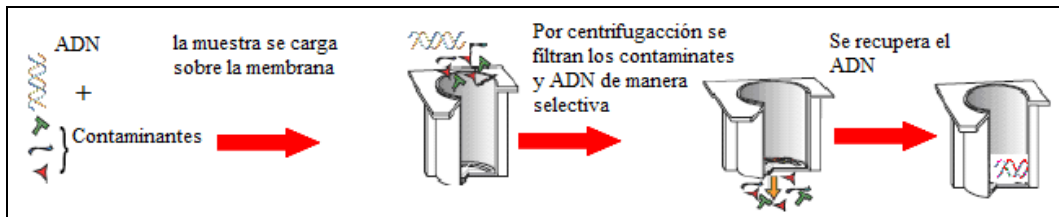


Figura 2. Fundamento sobre el cual funcionan las columnas de purificación de ADN.
Fuente: Fernández, 2000.

Después de la filtración el volumen aproximado que queda en la superficie de la membrana es de aproximadamente 25 a 50 μl . Para recogerlo sólo hay que acoplar el depósito de recogida de la muestra a la parte superior del Centricon que contiene la membrana, invertirlo y posteriormente se debe centrifugar brevemente. Se ha determinado en estudios anteriores que al manipular el ADN realizando lavados con agua y posteriormente concentrando la muestra mediante este sistema se consigue eliminar el 99% de las sales inhibidoras de la PCR contenidas en la muestra (Fernández, 2000).

CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS POR PCR EN TIEMPO REAL

La PCR en Tiempo Real consiste en la cuantificación de los productos de amplificación por PCR al mismo tiempo que esta tiene lugar. Esta cuantificación comienza durante los primeros ciclos de amplificación cuando la cantidad de producto amplificado sobrepasa un determinado umbral; lo cual depende del número de copias presentes en el extracto cuanto mayor es el número de copias presentes en la muestra de ADN, más rápido sobrepasa este umbral y se inicia la detección (Frías *et al*, 2008).

Existen dos tipos de químicas disponibles para realizar ensayos de cuantificación, SYBR-GREEN I y TaqMan MGB (Minor Groove Binding). La segunda técnica consiste en el diseño de una sonda específica complementaria a una región del producto que se desea amplificar (sonda TaqMan). Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* (FAMTM, TETTM o VICTM) y otro unido en el extremo 3' ó *quencher*

(TAMRATM). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como energía de transferencia de Förster. Si la secuencia de ADN complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada la sonda gracias a su actividad 5' nucleásica. Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador. La separación de la sonda de ADN posibilita que el proceso de extensión del *primer* continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado (anexo 3) (Fernández, 2000).

ANÁLISIS DE STRs CON ELECTROFORESIS CAPILAR

Primeramente se debe de realizar una PCR Múltiple, la cual consiste en combinar en una sola reacción todos los pares de imprimadores de las regiones que queremos amplificar simultáneamente junto con el resto de reactivos de la reacción en cantidades suficientes.

Dentro de las ventajas que presenta:

- Obtención de la información de varios loci en una sola reacción.
- Menor cantidad de templado en el análisis.
- Disminución del tiempo de análisis.
- Menor cantidad de reactivos.
- Rápida construcción de una base de datos (Lorente *et al*, 2007).

Diferentes laboratorios han desarrollado kits basados en el análisis de STRs con marcadores fluorescentes los cuales tienen un alto poder de discriminación para la identificación humana, un ejemplo es el Kit comercial IdentifilerTM (Applied Biosystems), con el cual se amplifican hasta 16 loci en la misma reacción, gracias al marcaje de uno de los imprimadores en el extremo 5' con fluorocromos (Martín, 2007), donde cada uno de los colores representa un grupo de STRs marcados con diferentes colorantes fluorescentes:

azul para los STRs marcados con el fluorocromo 6-FAM (5- carboxifluoresceína); verde para el VIC; amarillo para el NED; rojo para PET. En el proceso se separan los colores en diferentes componentes espectrales, cada uno de estos colores fluorescentes emite su máxima fluorescencia a diferente longitud de onda (Lorente *et al*, 2007).

Durante la colección de los datos en el analizador genético ABI Prism 3130® Applied Biosystems, el cual utiliza electroforesis capilar con un polímero desnaturizante, las señales fluorescentes se separan por un gradiente de difracción acorde con sus longitudes de onda: azul, verde, amarillo y rojo, bajo condiciones de temperatura, voltaje, etc., recomendadas por el fabricante para el análisis de microsatélites (figura 4). Esta tecnología permite que la caracterización de productos se realice mediante un análisis automatizado que convierte en alelos los picos que detecta en función de su movilidad asignándoles un tamaño, gracias a la incorporación de su estándar interno con fragmentos de longitud conocida y los resultados se expresan en electroferogramas (Lorente *et al*, 2007).

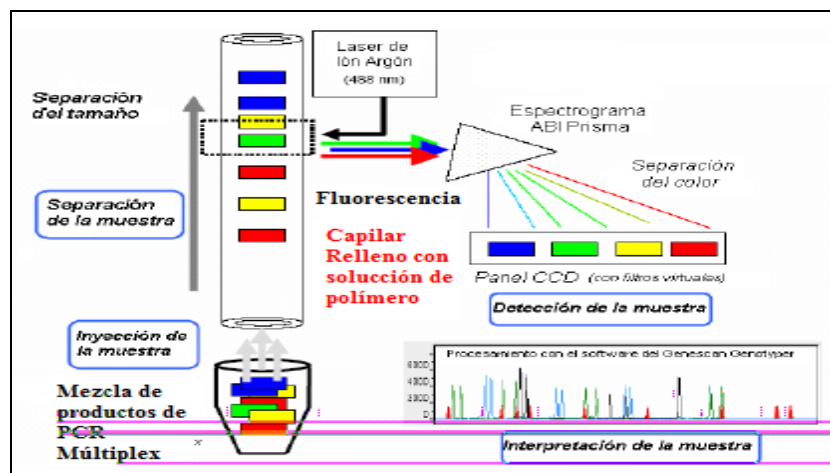


Figura 3. Pasos para la detección de STRs en la identificación de muestras biológicas de procedencia humana.

Fuente: Lorente *et al*, 2007.

POLIMORFISMOS ANALIZADOS EN GENÉTICA FORENSE

Los polimorfismos más estudiados y utilizados en los laboratorios de genética forense son los STRs tetraméricos de autosomas y de cromosoma Y, ambos forman parte del ADN

nuclear. Por otro lado se estudia el ADN mitocondrial, concretamente la región más estudiada es la conocida como región de control de ADN mitocondrial.

Los STRs son regiones de ADN repetitivo que se encuentran repartidas a lo largo del genoma, existiendo, como media un microsatélite cada 5000-10000 pares de bases y están compuestos por una secuencia de 2-7 pares de bases que se repite en tandem. Un gran número de estas regiones STR presenta un alto grado de polimorfismo genético de longitud, cuya base molecular es la variación en el número de unidades de repetición. El alto grado de polimorfismo de algunas de estas pequeñas regiones del genoma (100-400 pares de bases), la posibilidad de analizarlos mediante técnicas de muy alta sensibilidad (PCR) incluso a partir de muestras antiguas que contienen ADN en un avanzado estado de degradación y la posibilidad de realizar un tipaje genético de alta resolución que permite una asignación inequívoca de los alelos, son las razones fundamentales que han convertido a estos marcadores genéticos en los más utilizados en la actualidad en el campo de la genética forense (Lorente *et al*, 2007).

Existen situaciones en las que es recomendable el análisis de otros tipos de polimorfismos como son los polimorfismos de ADN mitocondrial y polimorfismos ligados al cromosoma Y. Muchos casos de identificación genética de restos cadavéricos y dientes antiguos sólo se pueden resolver mediante el análisis de pequeños fragmentos de genoma mitocondrial, ya que en ocasiones se trata del único ADN que puede recuperarse en forma reproducible en un gran número de restos humanos. Esto se debe fundamentalmente a que el ADN mitocondrial (ADNmt) es un genoma circular pequeño (16559 pb) que en contraposición al genoma nuclear, se encuentra en un gran número de copias (100-1000 copias por célula), debido a su compartimentalización dentro de la célula podría estar más protegido de la acción destructiva de las nucleasas (Lorente *et al*, 2007).

La aplicación de técnicas moleculares para estudiar los polimorfismos de ADNmt encuentra su justificación en lo siguiente:

- a) Cuando la cantidad de muestra de que se dispone es mínima.

- b) En la identificación de restos biológicos y el establecimiento de una relación familiar cuando no se dispone de los progenitores y no queda más remedio que realizar una comparación con familiares más lejanos. Si se trata de familiares vía materna tendrán exactamente el mismo ADN mitocondrial aunque se trate de familiares lejanos. Un estudio de ADN nuclear en estos casos sería poco informativo ya que cuanto más alejada sea su relación familiar menos alelos compartirán.
- c) Cuando existe un sospechoso en un hecho delictivo pero no se dispone de muestra indubitada (restos biológicos de procedencia conocida) del mismo, se puede recurrir al estudio de ADN mitocondrial de un familiar relacionado matrilinialmente para excluirlo.

En cuanto a los STRs de cromosoma Y, en la actualidad se realiza una amplificación simultánea de 12 STRs, con los que se ha aumentado el poder de discriminación de la técnica al contar con un número considerable de marcadores, los cuales son muy útiles en la resolución de casos que presentan las siguientes características (Martín, 2007):

- En casos de paternidad en los que se dispone de material biológico del padre, dado que los polimorfismos de cromosoma Y sólo se heredan vía paterna.
- Casos de paternidad en los que no existe presunto padre, de modo que otros parientes del hijo putativo como los hijos de tíos paternos pueden ser analizados mediante marcadores de cromosoma Y.
- Casos de mezclas como en agresiones sexuales en las que el semen del sospechoso se encuentra mezclado con células de la víctima.
- En catástrofes con alta mortalidad puede ser interesante clasificar los cadáveres según sus polimorfismos Y para poder discriminar que cadáveres se tienen que cotejar con cada familia antes de realizar los estudios de ADN nuclear (Prieto, 2007)

A continuación se muestra una lista de las reacciones de amplificación múltiples más usadas en la actualidad, así como los marcadores detectados en cada caso:

- a) Identifiler: Amelogenina, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, TPOX, CSF1PO, D3S1358, VWA, FGA, D5S818, D13S317, D16S539, D7S820, D2S1338 Y D19S433. (más detalles en anexo 4).
- b) Power Plex 16: Amelogenina, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, TPOX, CSF1PO, D3S1358, VWA, FGA, D5S818, D13S317, D16S539, D7S820, Penta E y Penta D.
- c) Power Plex Y: DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS393, DYS390 Y DYS385a/b.

La determinación del sexo se realiza en todas las muestras que se analizan amplificando una corta secuencia del gen de la amelogenina el cual se trata de un marcador muy útil que en el cromosoma X tiene una longitud de 106 pares de bases y en el cromosoma Y de 112 pares de bases (Martín, 2007).

Tanto el ADN mitocondrial como los polimorfismos del cromosoma Y tienen mucho menos poder de discriminación que el ADN nuclear autónomo utilizado habitualmente. Ninguno de estos tipos de ADN identifica individuos sino líneas familiares maternas y paternas, por tanto la coincidencia de estos polimorfismos entre muestras dubitadas e indubitadas se valora con menos fuerza (Prieto, 2007).

PROBLEMÁTICA ASOCIADA AL ANÁLISIS DE TEJIDOS ÓSEOS

En general en el análisis de ADN proveniente de restos óseos humanos las mayores dificultades con las que nos vamos a enfrentar son la degradación, las cantidades limitantes de ADN, la contaminación con ADN exógeno y las sustancias inhibidoras que pueden ser co-extraídas con el ADN. Otro problema fundamental de la investigación del ADN antiguo consiste en demostrar la autenticidad de los perfiles genéticos que se generan en este tipo de estudios, la posibilidad de obtener resultados que nada tienen que ver con el vestigio arqueológico en estudio (cuyo ADN se encuentra degradado y dañado molecularmente) y por el contrario obtener resultados a partir de pequeñas trazas de ADN moderno que contamina la muestra es una situación frecuente.

CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN DE RESTOS ANTIGUOS

Inmediatamente después de la muerte se ponen en marcha procesos autolíticos y de putrefacción cadavérica que dan lugar a la completa destrucción de los tejidos blandos. Los procesos destructores del cadáver son fundamentalmente autolíticos y de putrefacción, los mecanismos son diferentes en cada tejido y variables en función de las condiciones tanto intracelulares como extracelulares, así como la cantidad de agua y la temperatura, entre otros factores (Frías *et al*, 2008).

La putrefacción es un fenómeno de fermentación de la materia orgánica mediante procesos de reducción y oxidación como consecuencia de la actuación de los microorganismos, las bacterias existentes en la flora intestinal son las principales responsables de la putrefacción. En el proceso de putrefacción no solo intervienen las enzimas propias de las células, microorganismos, si no que también intervienen algunas especies de insectos y si se trata de cadáveres que permanecen en la intemperie o en el agua actúan otro tipo de animales de orden superior (Davoren *et al*, 2007).

Las muestras que mejor resisten los fenómenos de destrucción cadavérica y por tanto las que mantienen su estructura celular más intacta son los restos óseos y las piezas dentáreas (Martín, 2007).

Aunque los ácidos nucleicos preservan su estructura durante cierto tiempo, en general a partir de restos antiguos el material genético que se obtiene se encuentra bastante deteriorado y presenta distintos grados de degradación y modificación. Las cantidades de ADN humano obtenidas suelen ser muy pequeñas (del orden de subnanogramos), en cambio se extraen altas concentraciones de ADN total (del orden de picogramos); debido a que el ADN proveniente de los microorganismos suele superar más del 90% del ADN total.

En cuanto a la calidad, especialmente en las muestras antiguas, el ADN se encuentra degradado y como consecuencia es muy frecuente que sólo sea posible la extracción de

fragmentos muy pequeños (menores a 500 bases) de ADN; por ende el grado de degradación del ADN va a limitar la obtención de resultados. En general los marcadores genéticos de mayor tamaño se amplificarán con menor eficiencia que los más pequeños, incluso en ocasiones debido a la falta de una determinada longitud, no se obtendrán resultados o se producirán fenómenos de pérdida de alelos que pueden condicionar la fiabilidad de los resultados en estos marcadores. Por lo tanto una de las características que va a condicionar la eficiencia de amplificación de los STRs es su tamaño (Davoren *et al*, 2007).

DAÑOS MOLECULARES EN EL ADN

Dependiendo del grado de daños producidos en el ADN y por tanto la modificación que haya sufrido, podremos ó no acceder al estudio de ese material genético mediante técnicas de amplificación genética.

Los principales factores que causan las modificaciones o daños moleculares en el ADN son fundamentalmente los agentes oxidantes, las radiaciones (en especial las ultravioletas), la temperatura, la humedad, el pH, los procesos mecánicos y las enzimas, tanto las procedentes de las propias células, como las procedentes de microorganismos, en ambos casos cabe destacar a las nucleasas (Frías *et al*, 2008)

En el material genético se están produciendo de manera continua daños que principalmente afectan a los enlaces entre las bases nitrogenadas, los azúcares y a los enlaces fosfodiéster internucleótidos, pero al mismo tiempo actúan los mecanismos correctores; sin embargo después de la muerte estos efectos correctores se detienen (Martín, 2007).

Los principales cambios ó modificaciones que se producen en la estructura del ADN son cambios que afectan a los enlaces químicos que provocan la rotura de enlaces, los cuales conducen a la fragmentación de la cadena nucleotídica y por tanto a la degradación del ADN, estos daños son debidos fundamentalmente a fenómenos de hidrólisis y fenómenos oxidativos, éstos últimos afectan en especial a las bases derivadas de la pirimidina (timina y citosina). Las modificaciones de las bases nitrogenadas son un hecho común en el ADN,

como mínimo 1 de cada 10 pirimidinas se encuentran modificadas, lo cual es causado principalmente por las principales enzimas de degradación nucleasas que provienen del propio organismo en análisis, así como de microorganismos (Martín, 2007).

Un fenómeno importante que tiene gran importancia en éste tipo de material genético es la aparición de uniones inespecíficas entre cadenas de ADN (*cross-linking*), que pueden llegar a formar estructuras complejas por condensación de esas dobles cadenas de ADN y afectan a la amplificación genética. Las radiaciones de la luz ultravioleta provocan la formación de dímeros de pirimidina.

Todos estos daños en el ADN, van a dar lugar a que en el último término nos encontremos con un ADN muy degradado; la mayoría de los fragmentos tendrá un tamaño de 100-200 pb, aunque algunas moléculas pueden alcanzar tamaños de hasta 1000-2000 pb y éstos serán las que nos permitan la obtención de resultados para los marcadores STRs que se analizan en la actualidad, y que no superan los 350 pb de longitud (Martín, 2007).

CONTAMINACIÓN

En todas las muestras de restos cadavéricos va a haber contaminación producida por microorganismos, debido a ella además de extraer ADN humano correspondiente a la muestra se extrae de forma simultánea ADN proveniente de microorganismos y en general en unas cantidades mucho mayores que las de ADN humano. Esta contaminación puede tener efectos negativos en el análisis en el sentido de enmascarar la cantidad y calidad de ADN humano y en la amplificación de algunos marcadores pueden aparecer productos inespecíficos. En los STR que se utilizan en éste momento se ha realizado un estudio previo de la especificidad frente a templados bacterianos obteniéndose resultados negativos en todos los marcadores y para todos los microorganismos probados (Jiménez & Morera, 2007).

Uno de los mayores problemas que se presentan cuando se estudian restos óseos antiguos mediante técnicas de amplificación genética es la contaminación con ADN humano exógeno; debido a que si la cantidad a analizar presenta cantidades limitantes de ADN (subnanogramos) o este material genético se encuentra en un avanzado estado de

degradación, es muy frecuente una contaminación con ADN moderno exógeno por muy pequeña que sea esta cantidad, puede traer varias consecuencias graves en el análisis. La contaminación producida por ADN humano y moderno se puede considerar como la más grave de las descritas anteriormente, en primer lugar porque no puede diferenciarse del ADN antiguo y en segundo lugar porque al tratarse de ADN moderno y en buen estado, se amplifica con mayor eficiencia (Jiménez & Morera, 2007).

INHIBICIÓN

Debido a la presencia de inhibidores de la polimerasa en el soporte o en la propia muestra que no conseguimos eliminar en el proceso de extracción, es posible la no obtención de resultados de amplificación.

En los extractos de restos óseos es muy frecuente la presencia de inhibidores; componentes de bajo peso molecular, supuestamente derivados del medio de enterramiento que copurifican con el ADN (Frías *et al*, 2008). Se sabe por ejemplo que residuos de porfirinas y el colágeno de tipo I actúan como inhibidores de la polimerasa, así como algunos componentes del suelo como ácidos húmicos y fórmicos (Fernández, 2003). Una vez establecida la presencia de inhibidores en la muestra, se pueden tomar medidas para tratar de disminuir o eliminar su acción en el extracto, como por ejemplo:

- a) Eliminación: Purificación con lavados intensivos del ADN con buffers específicos para este fin, reextracción del ADN, purificación con cromatografía, utilización de minicolumnas de sílice que permiten el lavado de los contaminantes y la posterior recuperación del ADN
- b) Inactivación o bloqueo de la actividad del inhibidor mediante: choque térmico, adicción de BSA a la mezcla de reacción, adicción de cantidades extra de Taq polimerasa (aumentar los niveles de Taq facilita la amplificación incrementando la posibilidad de que moléculas diana con el cebador unido sean reconocidas y extraídas en los ciclos iniciales de la PCR) (Frías *et al*, 2008).

- c) Tratamiento desnaturizante con NaOH: Combina la estrategia de lavado del inhibidor en unidades Microcon 100 con un efecto inactivador por su alto pH. Bajo condiciones alcalinas, el ADN se encuentra en cadena simple, y ya que muchos de los inhibidores se intercalan en la doble cadena de ADN, la desnaturización puede disminuir significativamente su afinidad por el ADN, permitiendo su dilución y retirada del extracto. Sin embargo esta técnica tiene una aplicabilidad limitada para muestras límite, muy degradadas y con número de copias bajo debido a que la recuperación de ADN es aproximadamente el 50% del inicial y a la degradación que sufre el ADN de cadena simple por roturas de la cadena y renaturalización defectuosa (Bourke *et al*, 1999).
- d) Si no es posible retirar, inactivar o bloquear al inhibidor presente en un extracto, otra estrategia sería titular la cantidad mínima del inhibidor capaz de bloquear la reacción de PCR realizando diluciones seriadas del extracto (Frías *et al*, 2008).

OBJETIVOS

General

Evaluar tres metodologías distintas para la extracción de ADN de tejido óseo; con el fin de seleccionar un protocolo que proporcione las mejores condiciones en cuanto a la calidad, cantidad del ADN extraído y así mismo muestre los mejores resultados de amplificación para uso en análisis forense.

Específicos

Cuantificar y evaluar la calidad de ADN extraído mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.

Comparar la efectividad de tres metodologías de purificación y concentración del ADN, mediante la utilización de tres columnas comerciales diferentes QIAamp®, Centricon® YM-100 y Amicon® Ultra-4 en extractos de ADN realizados con el protocolo del FBI.

Comparar la efectividad de tres metodologías de purificación y concentración del ADN, mediante la utilización de tres columnas comerciales diferentes QIAamp®, Centricon® YM-100 y Centricon® YM-50 en extractos de ADN realizados con el protocolo de desmineralización.

Obtención del perfil genético de las muestras con el uso de Kits comerciales mediante electroforesis capilar en el analizador genético ABI Prism® 3130.

MATERIALES Y METODOS

1. Selección de muestras

Se seleccionaron muestras óseas de 11 individuos diferentes, procedentes del banco de muestras almacenadas a -20°C, en el Laboratorio de Bioquímica en la unidad de genética forense del OIJ. Estas son muestras que ya han sido previamente analizadas por PCR, obteniendo como resultado 6 amplificaciones positivas y 5 con resultados negativos, después de la realización de esta técnica. Al ser muestras que ya han sido utilizadas no hubo necesidad de limpiarlas nuevamente de residuos carnosos o impurezas. En el cuadro 1 se detalla la naturaleza de cada una de las muestras y la rotulación de las mismas; según el número de caso, número de autopsia, resultados de amplificación (previos a la realización de esta investigación) y códigos asignados a cada muestra para efectos de este trabajo respectivamente.

Cuadro 1. Rotulación de muestras de restos óseos analizadas.

DLCF	AUTOPSIA	INDICIO	RESULTADOS (anteriores a esta investigación)	CÓDIGO DE MUESTRA
06-0380-PEN	A-06-2397	fémur	Amplifica	A
07-0132-PAT	I-06-0134	fémur	Amplifica	B
06-0256-PEN	A-06-1999	fémur	Amplifica	C
07-0404-PEN	A-07-2471	fémur	Amplifica	D
07-0050-PEN	A-07-2302	fémur	Amplifica	E
07-1410-PAT	I-06-0092	fémur	Amplifica	F
06-0210-PEN	I-06-0063	fémur	No amplificó	G
06-0729-PAT	I-06-0018	fémur	No amplificó	H
06-2242-PAT	I-06-0072	fémur	No amplificó	I
07-0109-PEN	A-07-0753	Huesos y dientes	No amplificó	J
07-1677-PAT	I-06-0130	fémur	No amplificó	K

2. Pulverización de las muestras

2.1 Limpieza del equipo de pulverización

El equipo de pulverización utilizado fue el *Freezer Mill, Spex 6850* con sus respectivos viales de plásticos, la barra percusora y las piezas de los extremos de acero inoxidable. Los cuales se esterilizaron previamente mediante un primer lavado con detergente, el

percutor y las piezas de los extremos de acero inoxidable se limpiaron con hipoclorito de sodio al 3.5 %, luego se aclararon con agua, se enjuagaron con agua ultra pura estéril (mili-Q) y se secaron con papel filtro, se autoclavaron las piezas de plástico y de acero, se colocaron en la cámara de seguridad biológica con luz UV por el lapso de 1 hora.

2.2. Trituración

Las muestras se cortaron de manera individual en fragmentos de aproximadamente unos 3 cm de largo y uno de ancho (Anexo 5), con ayuda de una tijera metálica (cizalla plana) para obtener fragmentos lo suficientemente pequeños que puedan ser procesados por el *Freezer Mill, Spex 6850*.

En el interior de la campana de seguridad biológica se ensamblaron los viales depositando la muestra en el interior de estos. Una vez equipado el *Freezer Mill* con nitrógeno líquido, se colocaron los viales en el interior del molino, seguidamente se ajustó el equipo a 15 minutos de pre-enfriamiento con nitrógeno líquido y tres ciclos de pulverizado con 14 golpes por segundo durante 2 minutos. Cada ciclo de pulverizado estuvo intercalado por dos minutos de enfriamiento de la muestra.

Posterior al el proceso de pulverizado (figura 5), se introdujeron los viales en el interior de la campana de seguridad biológica y posteriormente se decantó el hueso pulverizado en tubos cónico de plástico estéril previamente rotulado con el código de cada muestra y se almacenaron en el congelador a -20°C .



Figura 4. Viales de polipropileno que contienen hueso pulverizado.
Fuente: Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008.

3. Extracción de ADN

Se probaron tres metodologías para extraer ADN de tejido óseo. El protocolo de desmineralización fue adaptado a las disposiciones de reactivos y equipos del laboratorio de genética forense (anexo 6, metodología de desmineralización sin modificación).

3.1. Método del *Federal Bureau of Investigation* (FBI)

Se colocó 0.5 g de hueso pulverizado en un microtubo de 1.5 ml, se agregó de 300-600µl de SEB (ver cuadro 2) y 2.0µl de proteinasa K (600 U/ml) por cada 300 µl de SEB al tubo. Se agitó el tubo ligeramente, se incubó a 56°C durante toda la noche en baño con agitación a 900 rpm. El siguiente día se centrifugó 3min/14000 r.p.m y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo. Al sobrenadante se le agregó de 300-600 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1); se agitó por 30 segundos hasta obtener una emulsión lechosa, se centrifugó por 3 minutos/1000 r.p.m y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo.

- Concentración y Purificación del ADN

El ADN se purificó y concentró con columnas Centricon® YM-100 (siguiendo las instrucciones del fabricante). Se hidrataron las columnas adicionando 400 µl de agua ultra pura estéril, se agregó el sobrenadante del extracto a la columna y se centrifugó a 3500 rpm/10min; luego se añadió otros 400 µl de agua y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Cuando el material retenido en el filtro fue de aproximadamente 50 µl, se invirtieron las columnas y se centrifugaron nuevamente a 3500 rpm por 5 minutos para recuperar el ADN extraído. Una vez realizado esto la muestra está lista para PCR y se almacenó a 4°C.

- Evaluación de dos métodos adicionales de purificación y concentración del ADN

Las columnas Centricon® (YM-100 y 50), Amicon® Ultra-4 y QIAamp de QIAGEN®, siguen un protocolo distinto, puesto que presentan un fundamento de filtrado diferente.

El ADN fue extraído según el protocolo del FBI. Una vez que se obtuvo el extracto de ADN se probaron dos columnas de purificación adicionales: Amicon® Ultra-4 100 K y las columnas de QIAamp. Las cuales fueron aplicadas según las indicaciones del fabricante.

3.2. Kit comercial Qiagen Blood Maxi Kit de QIAGEN®

Se colocó ≤ 100 mg de hueso pulverizado en un microtubo de 1.5 ml, se agregó 360 μ l de buffer ATL y 20 μ l de proteinasa K, se incubó toda la noche a 56°C. Brevemente se centrifugó el tubo para quitar gotas del interior de la tapa, se agregó seguidamente 300 μ l buffer AL y se agitó por 10s, se incubó la muestra a 70°C con agitación a 900 rpm por 10 min, se centrifugó a 14.000 rpm por 1 minuto y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo de 1.5 ml y se agregó 150 μ l de etanol (96- 100 %), se agitó por 15 s. Para mayores detalles del protocolo empleado ver anexo 7.

- Concentración y Purificación del ADN

El ADN se purificó y concentró con columnas de QIAamp (siguiendo las instrucciones del protocolo). Se transfirió el sobrenadante del paso anterior a la columna QIAamp MinElute en un tubo de 2ml, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto y se añadió 600 μ l del buffer AW1. Se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se colocó la columna en un tubo limpio de 2ml.

Se adicionaron 700 μ l del buffer AW2, 700 μ l de etanol (96- 100 %) y después de cada adicción se centrifugó bajo las mismas condiciones y la muestra se incubó a temperatura ambiente (15-25 ° C) durante 10 minutos, se añadió 50 μ l de buffer ATE en el centro de la membrana, se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto para recuperar el ADN. Una vez finalizado este proceso la muestra está lista para PCR y se almacenó a 4°C.

3.3. Desmineralización

La desmineralización es un método de extracción de ADN a partir de hueso, aplicado al análisis de muestras forenses, el cual representa una modificación de la descalcificación y fue publicado en el año 2007 (Loreille *et al*, 2007).

Se pesaron 0.25 g de polvo de hueso en un tubo cónico de 15 ml, se incubó con 4 ml de buffer de extracción (ver cuadro 2) en baño a 56 °C con agitación a 900 rpm por 24-36 h. al otro día se centrifugó 5 min a 14000 rpm, se recolectó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo cónico. Se agregó 4ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por 30s hasta obtener una emulsión lechosa, se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo cónico de 15 ml.

- Concentración y Purificación del ADN

El ADN se purificó y concentró con columnas Centricon® YM-50 (siguiendo las instrucciones del protocolo) (Loreille *et al*, 2007). Se hidrataron las columnas adicionando 400 µl de agua ultra pura estéril, se agregó el sobrenadante del extracto en dos ocasiones; en cada paso se trasvasó 2000 µl y se centrifugó a 3500 rpm/20min. Se realizaron dos lavados con 400 µl de agua. Cuando el material retenido en el filtro fue de aproximadamente 50 µl, se invirtieron las columnas y se centrifugaron nuevamente a 3500 rpm por 5 minutos para recuperar el ADN extraído, una vez realizado esto la muestra está lista para PCR y el extracto se almacenó a 4°C.

- Evaluación de dos métodos adicionales de purificación y concentración del ADN

El ADN fue extraído según el protocolo de desmineralizaciones, una vez que se obtuvo el extracto de ADN se realizó el proceso de purificación de los mismos mediante dos columnas de purificación adicionales Centricon® YM-100 (100.000 MW) y las columnas de QIAamp de QIAGEN®. Las cuales fueron aplicadas según las indicaciones del fabricante.

Cuadro 2. Resumen de procesos de extracción y purificación aplicados en cada metodología

Metodología	FBI	Desmineralización	KIT QIAGEN
Pulverización	<i>Freezer Mill 6850</i>		
Buffer de extracción e incubación por toda una noche	300µl de buffer SEB (NaCl 0.1M, Tris-HCl 1M, EDTA 0.5M, SDS 20%) 2.0µl de proteinasa K (20 mg/ml) a 56°C	4000 µl de 0.5M EDTA +100 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) a 56°C en agitación toda la noche.	Buffer ATL 360 µl de + 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a 56°C.
Desproteinización	300 µl de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)	4000 µl de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)	300 µl buffer AL 150 µl de etanol
Columnas de purificación y concentración de ADN propuestas por el protocolo	Centricon® YM-100	Centricon®YM-50	QIAamp
Columnas de purificación y concentración de ADN adicionales	Amicon®-Ultra 4 y QIAamp	Centricon ®YM-100 y QIAamp	NO SE REALIZO

4. Cuantificación de secuencias específicas de ADN mediante PCR en Tiempo Real.

Para la determinación de la cantidad de ADN amplificable presente en una muestra se utilizó el producto comercial Quantifiler[®] Human ADN Quantification Kit de Applied Biosystems.

La reacción de cuantificación combina dos ensayos de nucleasas 5', uno que contiene una sonda específica para una secuencia de ADN humano y otro con un control interno de PCR (IPC).

Sonda específica para ADN Humano

El ensayo con la sonda específica para ADN humano incluye dos imprimadores para la amplificación de ADN humano, una sonda TaqMan[®] MGB etiquetada con el fluorocromo FAM[™] para la detección de la secuencia amplificada (ver cuadro 3)

Cuadro 3. Descripción de la región de ADN humano de interés en la cuantificación.

Kit	Gen	Ubicación	Longitud del producto que se amplifica	Región que se amplifica	Ploidía
Quantifiler Human Kit	Gen de la telomerasa transcriptasa reversa	5p15.33	62 bases	Región no traducida (intrón)	Diploide

Control interno de PCR (IPC: *Internal PCR Control*)

Este ensayo incluye una plantilla de ADN IPC que es una secuencia sintética que no se encuentra en la naturaleza, un juego de imprimadores para la amplificación de esta plantilla y una sonda TaqMan[®] MGB etiquetada con el fluorocromo VIC[®] para la detección del ADN IPC amplificado.

Las sondas TaqMan MGB contienen:

Un fluorocromo reportero (FAM[™] o VIC[®]) unido al extremo 5' de la sonda, una modificación en el extremo 3' que contribuye a aumentar la Temperatura sin que sea necesario aumentar la longitud de la sonda y un “atenuador” no fluorescente en el extremo 3' de la sonda.

5. PCR Múltiple y Obtención del perfil genético.

Todos los dieciséis loci (anexo 4) fueron amplificados simultáneamente, mediante la utilización del Kit Identifiler de Applied Biosystems, el cual se utilizó con una concentración por muestra de acuerdo a lo señalado en el cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración de reactivos utilizados para la amplificación de muestras óseas con el kit Identifiler[™] de Applied Biosystems[®].

Compuesto	Concentración 1X
Agua para PCR	3.45 µl
Buffer 10X (Gold STR)	5.20 µl
10X Imprimadores	2.75 µl
Taq polimerasa (AmpliTaq Gold [®])	0.50 µl
Volumen de reacción	12.4 µl
ADN	1-10 µl (según resultado de cuantificación)

El Termociclador utilizado fue el Gene Amp PCR System 9700, con un cicleje de termociclado tal y como se muestra en el cuadro 5

Cuadro 5. Cicleje utilizado con el Kit Identifiler™.

Incubación inicial	Desnaturalización	Acoplamiento	Extensión	Extensión final	Paso Final
95 °C 3min	94 °C 1 min	59 °C 1 min	72 °C 1 min	60 °C 60 min	Almacenar a 4 °C
Total	28 CICLOS				

Montaje de los productos de PCR en el ABI Prism 3130®

Una vez terminada la corrida de PCR con el kit Identifiler se procedió a realizar el montaje de las muestras en el analizador genético ABI Prism 3130® (anexo 9). Para realizar este proceso se requirieron los siguientes materiales: ADN amplificado, escalera alélica (LADDER), marcador interno de corrida (LIZ), placas ópticas y formamida.

Se realizó una dilución del marcador interno utilizando la relación de 0.3ul de LIZ en 8.7ul de formamida, se colocó 9 ul de la dilución anterior, 1 ul de la muestra amplificada en cada pozo de la placa óptica y 3ul de la escalera alélica en el pozo destinado para este efecto. Se colocó la placa óptica a 100°C por 5 min para desnaturalizar el ADN y posteriormente se colocó en hielo por 5 min. Se introdujeron los datos en el sistema operativo del ABI indicando la posición de cada muestra en la placa y se introdujo la placa óptica en el ABI. El tamaño de los fragmentos y la designación alélica se realizó comparando con escaleras alélicas proporcionadas por el Kit mediante el programa Genemapper.

6. Análisis estadístico.

Todos los ensayos de cuantificación generaron resultados, los cuales fueron tabulados para ser analizados estadísticamente. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) completamente aleatorio.

RESULTADOS

Pulverización y Extracción de ADN de tejido óseo

Las muestras pulverizadas (Figura 5A) y los extractos de ADN (Figura 5B) mostraron estar relacionados con respecto al rendimiento expuesto durante el análisis, debido a la apariencia física que presentan. En la figura 5A se muestra como el ejemplar I-06-063 presentó un estado de degradación superior con respecto a la muestra A-06-2397 y a la vez durante la extracción de ADN esta conducta se mantiene (Figura 5B) debido a que las muestras con un estado de degradación mayor exhibieron una coloración marrón en el extracto de ADN asociado a la degradación del material genético y a la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras óseas, por lo contrario la muestra A-06-2397 tanto en su etapa pulverizada como en el extracto no exhibe el mismo comportamiento, al presentar un estado de preservación mas favorable.

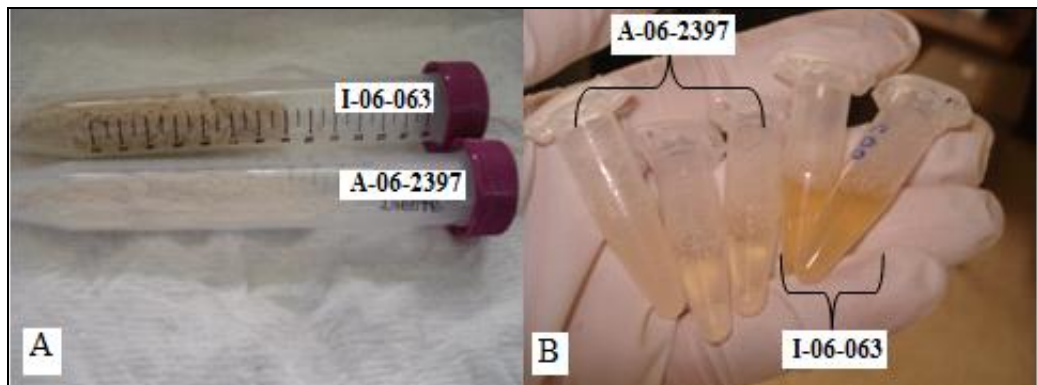


Figura 5. A) Apariencia física de muestras óseas pulverizadas (previo al análisis), B) color marrón presente en extractos de ADN (I-06-063).

Comparación de tres métodos de extracción de ADN

A continuación en el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN e inhibidores por PCR en Tiempo Real, así como del análisis de amplificación mediante el analizador genético ABI Prism 3130®, referentes a la comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de tejido óseo.

Cuadro 6. Resultados de cuantificación por PCR Tiempo Real del ADN e inhibidores y resultados de PCR obtenidos a partir de extractos de ADN procedentes de restos óseos; mediante la aplicación de tres metodologías diferentes. Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008.

PROTOCOLOS APLICADOS EN LA EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO ÓSEO										
Número de muestra	FBI			Desmineralización			KIT QIAGEN®			Resultados de PCR anteriores a este trabajo
	Centricon® YM-100 100.000 MMWL			Centricon® YM-50 50.000 MMWL			QIAamp®			
	CT del IPC	ng/µl	PCR	CT del IPC	ng/µl	PCR	CT del IPC	ng/µl	PCR	
A	32.40	12, 960	A	Indet *	9,090	A	28.85	0,324	A	A
B	33.81 *	18, 100	A	Indet *	4,990	A	29.71	0,829	A	A
C	29.00	0, 156	A	34.02 *	0,263	A	29.50	0,000	NA	A
D	29.13	0, 463	A	Indet *	0,739	A	29.13	0,049	NA	A
E	Indet*	>50, 000	A	Indet *	>50,000	A	34.29	>50,000	A	A
F	29.49	0, 118	A	Indet *	0,180	NA	29.61	0,019	NA	A
G	29.35	0, 0280	NA	Indet *	0,002	NA	29.53	0,000	NA	NA
H	29.02	0, 044	NA	Indet*	0,011	A	29.43	0,037	NA	NA
I	28.82	0, 003	NA	32.99 *	0,132	NA	30.14	0,000	NA	NA
J	29.96	0, 019	NA	Indet *	0,130	NA	29.30	0,008	NA	NA
K	29.20	0, 124	A	37.41 *	0,378	A	29.99	0,004	NA	NA
CP	28.81	0.3	A	28.81	0.3	A	28.81	0.3	A	
CN	28.61	Indet	NA	28.61	Indet	NA	28.61	Indet	NA	

CT= Umbral de detección de la cantidad de ADN presente en la muestra.

IPC= Control Interno de la PCR en Tiempo Real.

A= Amplifica.

A= Muestras que tenían resultados de amplificación negativos y mediante esta metodología amplificaron.

NA= No amplifica.

CP= Control Positivo.

CN= Control Negativo.

Indet= Cuando el IPC es mayor a 30, significa que hay presencia de una cantidad alta de inhibidores en la muestra.

Indet= cuando el IPC es menor a 30, no hay inhibidores.

Indet= Cuando la cuantificación es indeterminada y el IPC menor a 30, no hay ADN en la muestra.

*= extractos en los que se requirió realizar diluciones para amplificar las muestras.

Cuantificación por PCR en Tiempo Real

ADN

Los rendimientos obtenidos en la cuantificación de las muestras óseas provenientes de las metodologías de extracción de ADN correspondientes al FBI y desmineralización mostraron valores de cuantificación positivos (<0.5 ng/ μ l) con tendencias muy similares y los valores mas inferiores en cuanto a este rubro se alcanzaron mediante la implementación de Kit de QIAGEN® (Figura 6).

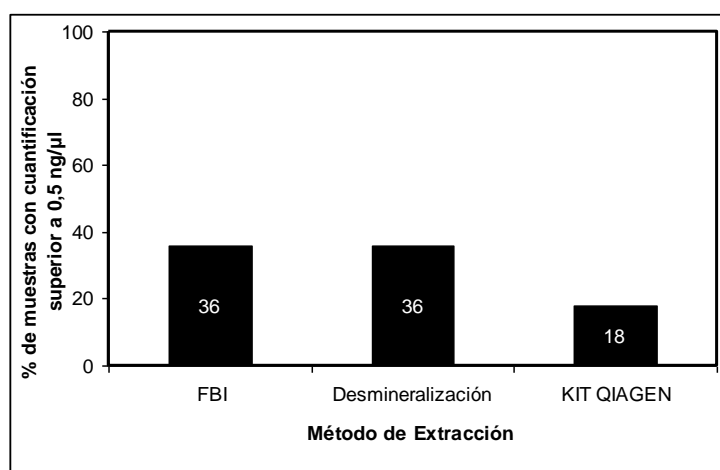


Figura 6. Comparación de la cuantificación de ADN obtenida por tres metodologías diferentes.

Inhibidores

Se detectó la presencia de inhibidores de la PCR en todas las muestras analizadas mediante la técnica de desmineralización y el menor porcentaje mediante la aplicación del Kit de QIAGEN® (Figura 7).

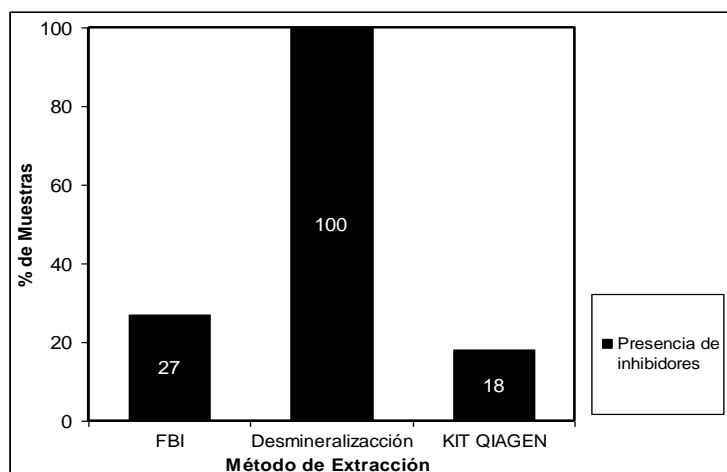


Figura 7. Comparación del porcentaje de muestras con presencia de inhibidores en tres metodologías diferentes de extracción de ADN.

PCR Múltiple y Obtención del perfil genético

La metodología de desmineralización y del FBI presentaron comportamientos similares mediante la cuantificación de ADN (figura 6) y en la amplificación de STRs (figura 8), debido a que tanto en la cuantificación como en la amplificación fueron los protocolos que alcanzaron mayor porcentaje de muestras con cuantificación positiva, así como tendencias similares y por otro lado opuestas a los rendimientos logrados por el kit comercial.

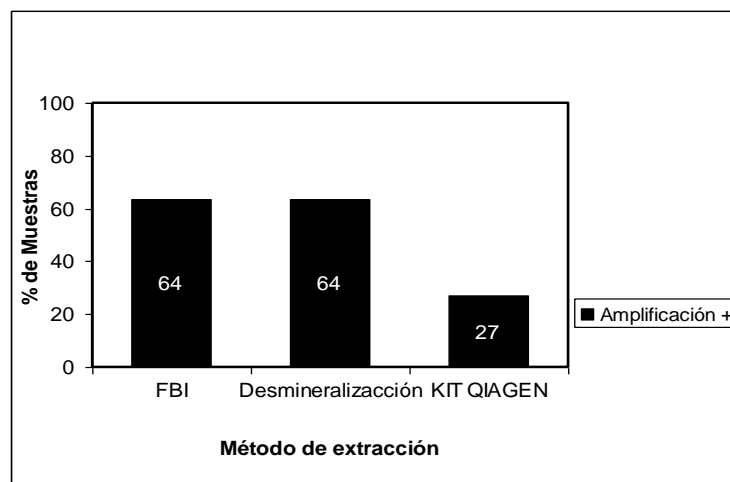


Figura 8. Comparación del porcentaje de amplificación de STRs en tres metodologías distintas de extracción de ADN.

Comparación de tres métodos de purificación y concentración del ADN a los extractos obtenidos con el protocolo del FBI

En el cuadro 7 se muestran los resultados de cuantificación de ADN e inhibidores por PCR en Tiempo Real, así como del análisis de amplificación mediante el analizador genético ABI Prism 3130®, correspondientes al ensayo realizado para la comparación de tres métodos de purificación en extractos de ADN realizados con el método del FBI.

Cuadro 7. Resultados de cuantificación por PCR Tiempo Real del ADN e inhibidores y resultados de PCR obtenidos con el método del FBI posterior purificación mediante la aplicación de tres metodologías diferentes. Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008

Número de muestra	EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE EL MÉTODO DEL FBI									Resultados de PCR anteriores a este trabajo
	MÉTODOS DE PURIFICACIÓN									
	Amicon® Ultra-4			QIAamp			Centricon YM-100 100.000 MMWL			
	CT del IPC	ng/µl	PCR	CT del IPC	ng/µl	PCR	CT del IPC	ng/µl	PCR	
A	29.75	2,450	A	29.35	0,193	A	32.40	12, 960	A	A
B	29.78	4,080	A	29.65	0,506	A	29.03	18, 100*	A	A
C	29.86	0,044	NA	29.45	0,099	NA	29.00	0, 156	A	A
D	29.29	0,107	A	29.41	0,000	NA	29.13	0, 463	A	A
E	36.88	>50,000*	A	29.83	0,574	A	29.41	>50, 000*	A	A
F	29.31	0,062	NA	29.46	0,000	NA	29.49	0, 118	A	A
G	**	**	**	29.17	0,000	NA	29.35	0, 0280	NA	NA
H	**	**	**	29.22	0,000	NA	29.02	0, 044	NA	NA
I	**	**	**	29.88	0,000	NA	28.82	0, 003	NA	NA
J	30.63	0,053	A	29.74	0,000	NA	29.96	0, 019	NA	NA
K	**	**	**	29.67	0,005	NA	29.20	0, 124	A	NA
CP	28.81	0.3	A	28.81	0.3	A	28.81	0.3	A	
CN	28.61	Indet	NA	28.61	Indet	NA	28.61	Indet	NA	

CT= Umbral de detección de la cantidad de ADN presente en la muestra.

IPC= Control Interno de la PCR en Tiempo Real.

A= Amplifica.

A= Muestras que tenían resultados de amplificación negativos y mediante esta metodología amplificaron.

NA= No amplifica.

CP= Control Positivo.

CN= Control Negativo.

Indet= Cuando el IPC es mayor a 30, significa que hay presencia de una cantidad alta de inhibidores en la muestra.

Indet= cuando el IPC es menor a 30, no hay inhibidores.

Indet= Cuando la cuantificación es indeterminada y el IPC menor a 30, no hay ADN en la muestra.

*= extractos en los que se requirió realizar diluciones para amplificar las muestras.

**= No hubo muestra ósea para realizar este análisis.

Cuantificación por PCR en Tiempo Real

ADN

En la figura 9 se observa como mediante el protocolo del FBI, las columnas de purificación que reflejaron cumplir más exitosamente la función de concentrar el ADN simultáneamente evitando la degradación del mismo fueron las Centricon® YM-100. De la misma manera estas columnas al concentrar mayor cantidad de ADN retuvieron consigo mayor cantidad de inhibidores (figura 10), mientras que los dispositivos QIAamp® presentaron un rendimiento contrario en la ejecución de estas funciones.

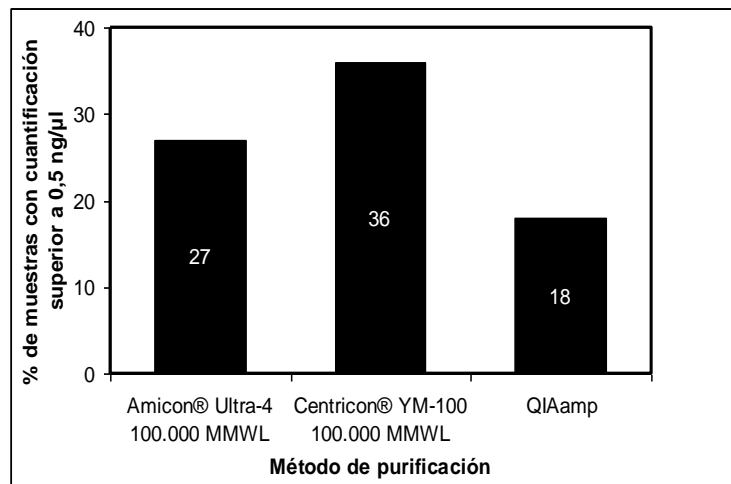


Figura 9. Resultados de medias de cuantificación obtenidas mediante la aplicación de tres metodologías de purificación de ADN.

Inhibidores

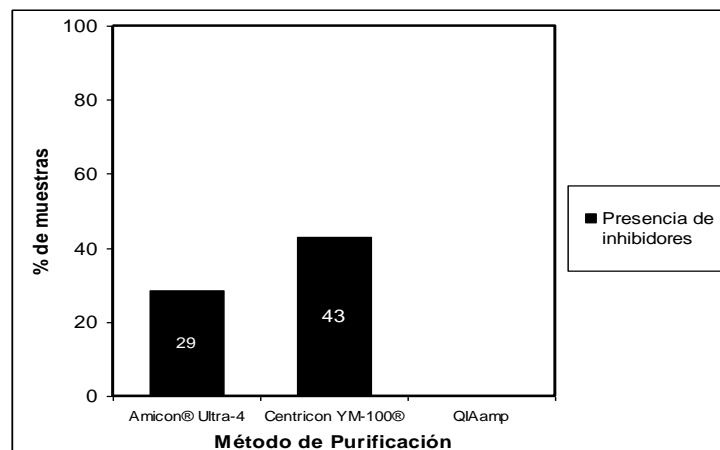


Figura 10. Comparación de inhibidores presentes en tres métodos de purificación de ADN en extractos del FBI.

PCR Múltiple y Obtención del perfil genético

Mediante la utilización de las columnas Centricon® YM-100 en el protocolo del FBI se logran amplificar mayor cantidad de muestras óseas en comparación con las Amicon® Ultra-4 y QIAamp® (Figura 11).

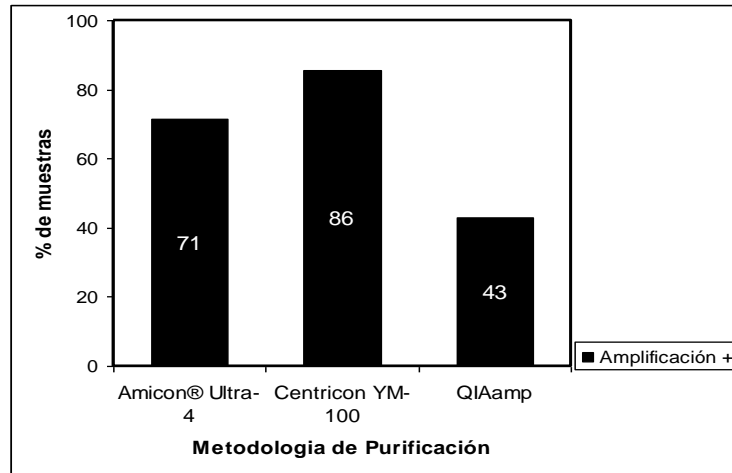


Figura 11. Resultados de amplificación de STRs mediante la aplicación de tres métodos de purificación diferentes en extractos del FBI.

Comparación de tres métodos de purificación y concentración del ADN a los extractos obtenidos con el protocolo de desmineralización

En el cuadro 8 se muestran los resultados de cuantificación de ADN e inhibidores por PCR en Tiempo Real, así como del análisis de amplificación mediante el analizador genético ABI Prism 3130®, correspondientes al ensayo realizado para la comparación de tres métodos de purificación en extractos de ADN realizados con el método de desmineralización.

Cuadro 8. Resultados de cuantificación por PCR Tiempo Real del ADN e inhibidores y resultados de PCR obtenidos con el método de desmineralización y la posterior purificación mediante la aplicación de tres metodologías diferentes. Laboratorio de Genética Forense del C 2008

EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE EL MÉTODO DE DESMINERALIZACIÓN										
Número de muestra	MÉTODOS DE PURIFICACIÓN									Resultados de PCR anteriores a este trabajo
	Centricon YM-50 50.000 MMWL			Centricon YM-100 100.000 MMWL			QIAamp			
	CT del IPC	ng/µl	PCR	CT del IPC	ng/µl	PCR	CT del IPC	ng/µl	PCR	
A	Indet*	9,090	A	31.00*	4,940	A	29.08	0,258	A	A
B	Indet*	4,990	A	Indet*	0,076	NA	29.58	0,284	A	A
C	34.02*	0,263	A	Indet*	0,004	NA	28.80	0,000	NA	A
D	Indet*	0,739	A	33.23*	0,019	A	29.04	0,029	NA	A
E	Indet*	>50,000	A	Indet*	0,122	A	29.54	7,050	A	A
F	Indet*	0,180	NA	Indet*	0,008	NA	28.93	0,000	NA	A
G	Indet*	0,002	NA	Indet*	0,000	NA	29.27	0,000	NA	NA
H	Indet*	0,011	A	Indet*	0,012	NA	30.05	0,000	NA	NA
I	32.99*	0,132	NA	Indet*	0,000	NA	29.42	0,000	NA	NA
J	Indet*	0,130	NA	Indet*	0,032	NA	28.93	0,000	NA	NA
K	37.41*	0,378	A	Indet*	0,005	NA	28.74	0,000	NA	NA
CP	28.81	0.3	A	28.81	0.3	A	28.81	0.3	A	
CN	28.61	Indet	NA	28.61	Indet	NA	28.61	Indet	NA	

CT= Umbral de detección de la cantidad de ADN presente en la muestra.

IPC= Control Interno de la PCR en Tiempo Real

A= Amplifica.

A= Muestras que tenían resultados de amplificación negativos y mediante esta metodología amplificaron.

CP= Control Positivo.

CN= Control Negativo.

Indet= Cuando el IPC es mayor a 30, significa que hay presencia de una cantidad alta de inhibidores en la muestra.

Indet= cuando el IPC es menor a 30, no hay inhibidores.

Indet= Cuando la cuantificación es indeterminada y el IPC menor a 30, no hay ADN en la muestra.

*= extractos en los que se requirió realizar diluciones para amplificar las muestras.

Cuantificación por PCR en Tiempo Real

ADN

La manera idónea de realizar la desmineralización es mediante el uso de columnas de ultrafiltración Centricon® YM-50; Debido a que con el uso de estas se obtuvo mejores resultados en la cuantificación por PCR (Figura 12); sin embargo con las mismas se detectó la mayor cantidad de inhibidores en el extracto de ADN (Figura 13).

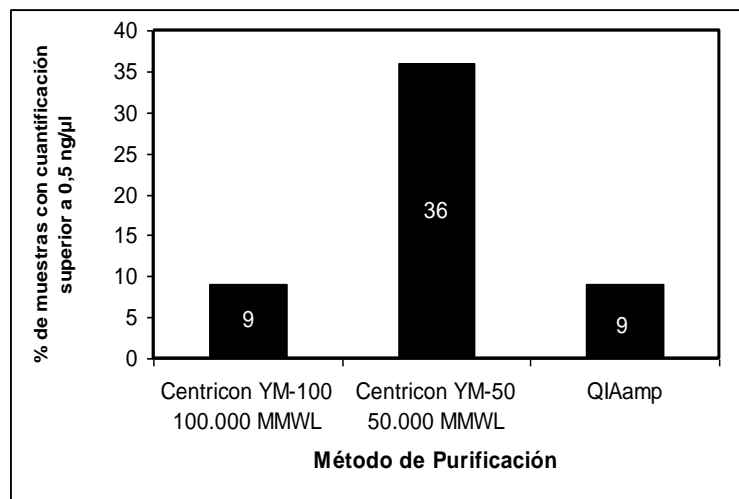


Figura 12. Resultados de cuantificación de ADN mediante tres metodologías de purificación de ADN en el protocolo de desmineralización.

Inhibidores

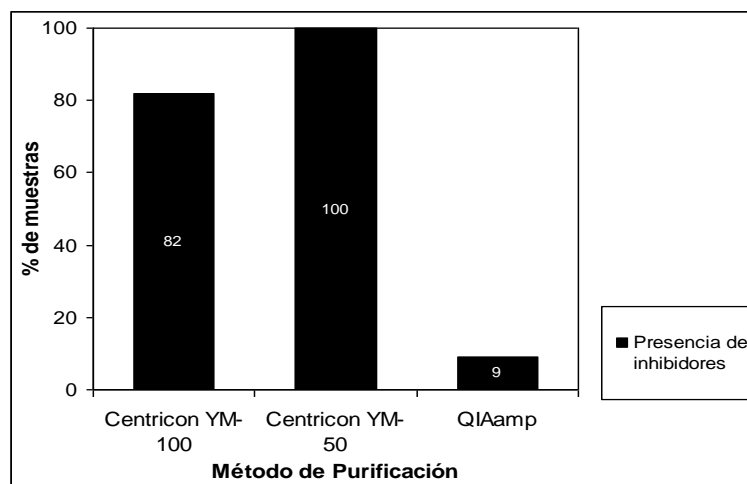


Figura 13. Eficiencia en la purificación de ADN mostrada por tres columnas distintas en extractos realizados con la metodología de desmineralización.

PCR Múltiple y Obtención del perfil genético

Según se muestra en la figura 14 en la desmineralización es más conveniente realizar el proceso de purificación con columnas Centricon® YM-50; debido a que mediante estas se obtuvo los mejores índices de amplificación en comparación con las Centricon® YM-100 y las QIAamp®.

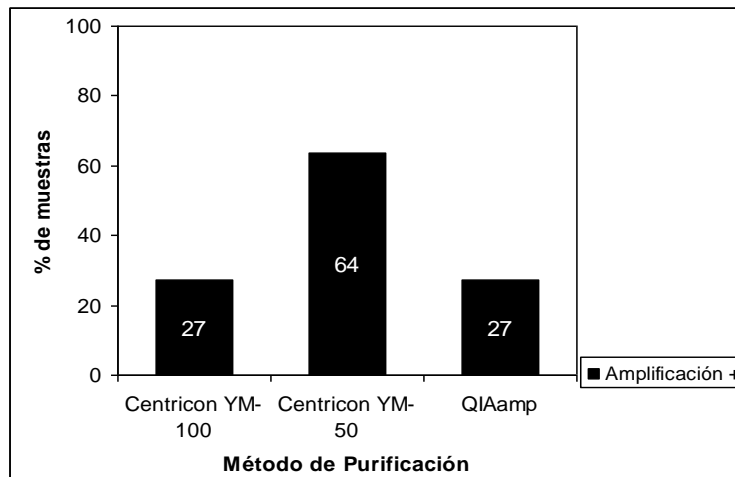


Figura 14. Resultados de amplificación de STRs mediante la aplicación de tres métodos de purificación diferentes de extractos realizados mediante la técnica de desmineralización

DISCUSIÓN

Los protocolos experimentados en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo a la disposición de reactivos y equipos técnicos presentes en el laboratorio; sin embargo los factores preponderantes en la toma de esta decisión fueron los buenos rendimientos obtenidos por estos y la actualidad de las investigaciones en las que fueron implementados. El protocolo de desmineralización fue publicado en el año 2007 y fue realizado en el Laboratorio de Identificación de ADN de las Fuerzas armadas de los Estados Unidos (Loreille *et al*, 2007), el kit comercial Qiagen Blood Maxi Kit es el último implementado por la casa comercial QIAGEN® para la extracción de ADN a partir de hueso y el protocolo del FBI es el empleado actualmente para llevar a cabo esta pericia genética en el laboratorio de Genética Forense.

La cuantificación por PCR tiempo Real representa la técnica más sensible y específica que existe actualmente en el mercado para la cuantificación de ADN procedente de muestras forenses, es por esto que en esta investigación se justifica la utilización de esta técnica para la cuantificación en todas las muestras. Los análisis estadísticos realizados para la evaluación de esta variable mostraron que no hay diferencias significativas entre los tres métodos de extracción ($p=1,04$) (anexo 8); sin embargo en cuanto a las especificaciones del Kit Identifiler™ y a la experiencia en este laboratorio, se considera que la cuantificación es aceptable (buena) o que existen posibilidades de amplificación si el resultado de cuantificación es igual o superior a $0.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ³. Con respecto a esta prueba tanto el método de desmineralización como el del FBI obtuvieron un 36% de muestras con cuantificación positiva (Figura 6); sin embargo de acuerdo a la experiencia en el laboratorio y a los resultados expuestos en este trabajo más adelante, muchas de las muestras con valores inferiores a lo establecido por el kit ($0.1\text{-}0.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$) amplifican o tienen posibilidades de amplificación.

Previo a la desmineralización el protocolo que principalmente fue investigado y aplicado por laboratorios de genética forense es la descalcificación. La descalcificación a pesar de mostrar muchas similitudes con la desmineralización, implica la incubación del hueso

³ Applied Biosystems®. 2000. Manual de uso del Kit AmpFISTR® Identifiler™.

pulverizado en EDTA 0.5 M por 24 horas, después de éste lapso se descarta el buffer y se adiciona nuevamente EDTA (este proceso se repite por 3-5 días) (Hochmeister *et al*, 1991). Es por lo anterior que mediante la utilización del método de descalcificación se generó mucha controversia; debido a que cada vez que se realiza un lavado con el fin de desechar el calcio y el EDTA es descartado consigo el ADN disuelto en la solución (Loreille *et al*, 2007) y por ende se obtiene menor cantidad de ADN mediante este método con respecto a los convencionales; esta es la mayor razón por la cual con éste protocolo a pesar de mostrar muchas semejanzas con la desmineralización, no se logró determinar la superioridad en rendimiento sobre los métodos convencionales de extracción de ADN de hueso (Goodwin & Ovchinnikov, 2001).

Sin embargo con la utilización del protocolo de desmineralización se alcanzó establecer que presenta rendimientos superiores a los métodos convencionales (Loreille *et al*, 2007) y en éste trabajo se refuerza esta aseveración; esto se debe a que el tejido óseo está constituido por una fase mineral y una fase orgánica. La fase mineral está formada por fosfato de calcio, carbonato de calcio, fluoruro de calcio, hidróxido de calcio, organizados en la forma cristalina conocida como hidroxiapatita. Alrededor del 70% del hueso lo constituye el mineral, mientras que un 30% lo representa la matriz orgánica, constituida en un 90% por la proteína de colágeno. (González *et al*, 2008) todas estas áreas representan barreras físicas para la extracción de ADN (Loreille *et al*, 2007); debido a que la doble hebra de ADN tiene fuerte afinidad por la hidroxiapatita, la cual debe ser removida para recuperar el ADN inmerso en ella (Jiménez & Morera, 2007).

Los protocolos usualmente utilizados para extraer ADN a partir de huesos y dientes están basados en la incubación del material pulverizado en una solución que contiene EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) dentro del buffer de extracción. Esta solución ácida puede actuar como un agente desmineralizador en estos tejidos, ocasionando que el contenido de calcio residual de la matriz ósea disminuya periódicamente (Figura 15), y a medida que se elimina el mineral del hueso, el porcentaje de masa retenida disminuye al perder la estabilidad térmica la macromolécula de colágeno (anexo 10), como consecuencia de la pérdida de interacción entre los cristales de hidroxiapatita y la matriz de

colágeno óseo. Por ende la matriz ósea desmineralizada permite una mayor exposición del ADN al hallarse libre del recubrimiento mineral y del colágeno (González *et al*, 2008).

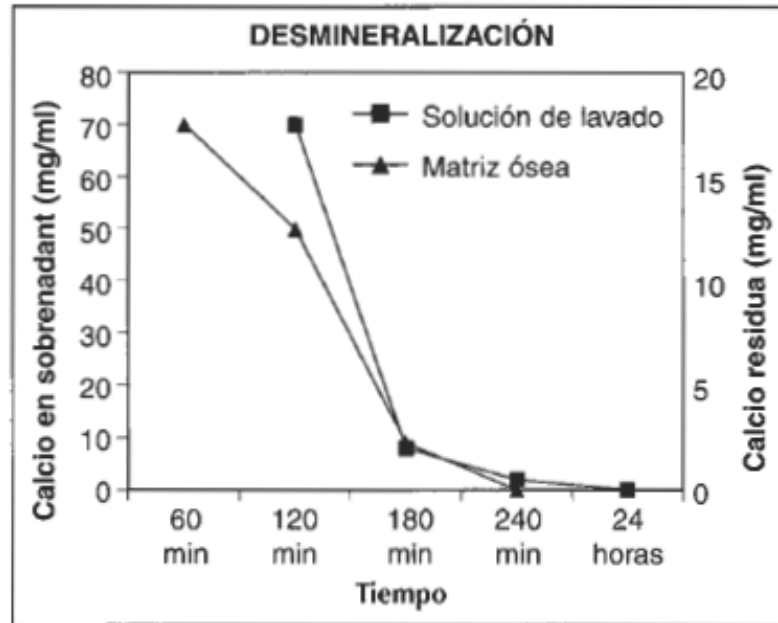


Figura 15. Evolución del proceso de desmineralización.

Fuente: Sáez *et al*, 2004

En cuanto a los factores que hacen del protocolo de desmineralización un método prometedor para la realización de esta pericia genética se encuentran los encargados que determinar la efectividad del reactivo EDTA; entre los que tenemos la concentración adecuada del EDTA y del volumen utilizado de este en el buffer; se ha demostrado que para disolver completamente 1g de hueso pulverizado son necesarios 15 ml de EDTA 0.5M (Loreille *et al*, 2007).

En el anexo 11 se presentan las diferencias en el proceso de desmineralización en función del volumen de solución ácida utilizada; debido a que al emplear menor proporción de EDTA 0.5M, la cantidad de calcio extraída con el buffer se ve limitada por el grado de saturación resultante, de este modo con 10 ml de solución ácida por gramo de matriz ósea inicial, a las 24 horas todavía queda abundante calcio en el sobrenadante y el proceso debe alargarse en el tiempo. Por el contrario una proporción de 50 ml de EDTA 0.5M para la misma cantidad de hueso se muestra capaz de extraer todo el calcio (Sáez *et al*, 2004).

El protocolo de desmineralización aplicado en este trabajo mediante la incubación del pulverizado en altos volúmenes de EDTA, garantiza que el polvo es totalmente disuelto en la solución de EDTA; y por ende que los componentes químicos del buffer como la proteinasa K (en la cual se utilizan grandes volúmenes con respecto a los protocolos convencionales) tiene mayor contacto con cada célula para realizar la lisis celular y a su vez el EDTA para retirar completamente todo el contenido mineral presente en cada una de las partículas de hueso.

Otro factor preponderante que influye positivamente en la desmineralización, con respecto a los otros dos protocolos utilizados en esta investigación, se debe a que en protocolos estándar utilizan de 1-2 g de hueso; sin embargo la cantidad de hueso utilizada en la desmineralización es de 0.25 g, lo cual representa una cantidad de tejido significativamente inferior a la empleada en el protocolo del FBI, como consecuencia de que en este se utiliza aproximadamente 0.5 g, disueltos en un volumen de buffer de 300 μ l; lo cual dificulta el contacto de todo el contenido de hueso presenten la solución con el buffer de extracción y que por ende exista una cantidad considerable de tejido óseo, así como de buffer de extracción que no son utilizados en la extracción de ADN (Sáez *et al*, 2004) ; lo cual incide directamente en que la cantidad de ADN extraída durante el proceso en el protocolo del FBI sea inferior.

Adicionalmente el EDTA ofrece otras ventajas como la de actuar en la inactivación de ADNasas mediante la captación de cationes divalentes, los cuales actúan como cofactores de las mismas, tal es el caso de el Mg^{2+} o Ca^{2+} , evitando así la degradación del ADN recuperado (Loreille *et al*, 2007).

Uno de los problemas más importantes que presenta el análisis de muestras óseas es la presencia de inhibidores en la PCR; tales como ácidos húmicos y fúlvicos (moléculas abundantes en el suelo), residuos de porfirinas; debido a que con sólo 100 ng/ μ l de estos compuestos son suficientes para la inhibición total de la amplificación; puesto que tienden a formar agregados con las moléculas de ácidos nucleicos y quedan así retenidos junto con el ADN en la membrana de las columnas de purificación (Arroyo *et al*, 2003).

Según se reporta en la literatura basta con realizar una previa inspección ocular de la muestra, precedentemente a la extracción de ADN en particulares tales como la apariencia física y estado de conservación que presenta; para poder prever si se trata o no de una muestra que durante la realización del análisis se comportará como de difícil manejo (Goodwin & Ovchinnikov, 2001). Tal es el caso de las muestras expuestas en la figura 5A, en las cuales visualmente se aprecia la muestra I-06-063 con una coloración y apariencia que indican que se encuentra en un estado de degradación más avanzado con respecto al ejemplar A-06-2397; por consiguiente este aspecto físico distingue a la muestra I-06-063 como una muestra problemática para el análisis y efectivamente durante este estudio así mostró ser, puesto que esta característica se mantuvo durante todo el proceso, tal y como se aprecia en la figura 5B en este mismo ejemplar persiste la misma coloración marrón después de realizar el proceso de extracción del ADN; este aspecto es asociado directamente con la presencia de inhibidores en los ácidos nucleicos, los cuales fueron detectados mediante PCR Tiempo Real (Goodwin & Ovchinnikov, 2001). Contradictoriamente a la muestra I-06-063 el ejemplar A-06-2397 exhibió desde el inicio del análisis un estado de conservación mejor (coloración blanquecina), lo cual fue reflejado directamente en los resultados de cuantificación, ya que estos fueron superiores en comparación con las muestras que durante esta investigación presentaron estas particulares. Estas características prevalieron en todas las muestras óseas que mostraron ser difíciles y tener resultados de amplificación negativos en éste estudio.

Con respecto a la evaluación de los métodos empleados por cada metodología para purificar el ADN; el método más eficiente para eliminar los inhibidores son las columnas de QIAamp del Kit comercial de QIAGEN®; debido a que con la aplicación de las mismas se obtuvo el menor porcentaje de inhibidores presentes en la muestra; no obstante este método presentó el inconveniente de que la reducción en el porcentaje de inhibidores mediante el uso de estas columnas fue proporcional a la disminución en la concentración de ADN recuperado (figura 7).

Contrario a los rendimientos obtenidos por el kit, los protocolos de desmineralización y del FBI muestran tener un comportamiento en la cuantificación superior y a la vez similar entre ambos. La desmineralización presentó el mayor porcentaje de extractos con presencia de inhibidores, lo cual contradice lo citado en la literatura, puesto que en este proceso al

requerir menor cantidad de hueso para realizar el análisis conduce a que a su vez se reduzcan significativamente los problemas de inhibición en el ADN (Loreille *et al*, 2007); así mismo los rendimientos reportados en la literatura se deben a que en este método se requiere de la utilización de columnas de purificación eficientes, de procesos de purificación adicionales y a que en este protocolo existe la alternativa de que muestras como la I-06-063 (figura 5) pueda ser incubada en la solución ácida por un periodo de tiempo mayor a las 12 horas; con el fin de eliminar o atenuar la apariencia marrón que presenta el extracto (Loreille *et al*, 2007).

Con respecto a los rendimientos obtenidos en la amplificación de las muestras óseas, estos rubros muestran ser consecuencia directa de los resultados de cuantificación; puesto que con la metodología del Kit se lograron valores de cuantificación muy inferiores a los otros dos protocolos y a su vez se obtuvieron los índices de amplificación más bajos de las tres metodologías. Por otro lado con la utilización de la desmineralización y el método del FBI se da una situación de amplificación similar (figura 8) ya que mediante la desmineralización no se logró amplificar una muestra que anteriormente a la realización de este trabajo presentaba resultados de amplificación positivos; sin embargo mediante esta misma metodología se consiguió amplificar dos muestras que no habían amplificado. Con el protocolo del FBI amplificaron todas las muestras que tenían rendimientos en la amplificación positivos y una muestra que presentaba un precedente de amplificación negativo (cuadro 6). Este último resultado muestra la alta susceptibilidad en la realización de estas pruebas debido a que con la aplicación de una misma metodología los resultados pueden variar de acuerdo al analista que realiza el proceso.

A pesar de la similitud mostrada por los resultados de amplificación y cuantificación en las metodologías de desmineralización y del FBI, es más recomendable la aplicación de la técnica de desmineralización para llevar a cabo el análisis de muestras óseas muy degradadas o con alta concentración de inhibidores y por tanto que no lograron ser amplificadas por el método del FBI, pues fue mediante esta metodología que en muestras consideradas como muestras difíciles se logró amplificar dos con procedencia de amplificación negativa y a la vez se alcanzó valores de cuantificación mayores a los del FBI (cuadro 6), como consecuencia de esto en muestras que presentan este patrón existe una mayor gama de

posibilidades para lograr amplificación por PCR, como lo son la realización de diluciones o variar la concentración de los reactivos de la PCR, entre otros (Bourke *et al*, 1999).

El ensayo realizado con el fin de llevar a cabo la comparación de tres métodos de purificación y concentración del ADN en el protocolo del FBI, fue con el propósito de determinar las fortalezas y debilidades que presenta ésta técnica (la cual es aplicada actualmente en el laboratorio de genética forense), así como de llevar a cabo un análisis probabilístico de amplificación de las muestras que anteriormente mostraron resultados de amplificación negativos mediante esta metodología de extracción de ADN.

En este trabajo se realizaron pruebas adicionales con las columnas Amicon® Ultra-4, debido al requerimiento del laboratorio para la introducción de un nuevo dispositivo para llevar a cabo la purificación y concentración de ADN en el protocolo del FBI, con el fin de sustituir las columnas Centricon YM-100 y a su vez se experimentaron con las columnas QIAamp como una posibilidad más para lograr designar las columnas más adecuadas para realizar este análisis.

En el análisis estadístico realizado con el fin de evaluar los tres métodos de purificación con respecto a la cuantificación, reveló que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p=1,00$) (anexo 8); sin embargo con las columnas Centricon YM-100 el porcentaje de muestras que obtuvieron una cuantificación superior a 0,5 ng/μl fue significativamente mayor al logrado por las columnas Amicon® Ultra-4 y QIAamp (Figura 9). Esto se debe a que el fundamento de filtrado que presentan los dispositivos Amicon Ultra- 4® es menos selectivo que el utilizado por las columnas Centricon, ya que permite la pérdida de una cantidad considerable de ADN durante el proceso de filtrado, otro factor preponderante en este rendimiento es el de presentar una constitución física diferente a las centricon (anexo 2), la cual no permite el contacto de la totalidad del extracto de ADN con la membrana de filtración; esto conlleva a que el ácido nucleico presente en la solución no se adhiera correctamente a la membrana destinada para este fin y la función primordial de estos dispositivos con respecto a la concentración del ADN es lleve acabo de manera deficiente.

Con respecto a la segunda función que cumplen las columnas de purificación de ADN en cuanto a la eliminación de la mayor cantidad de inhibidores presentes en el extracto en el protocolo del FBI, las columnas que presentaron un rendimiento inferior fueron las centricon YM-100 (figura 10), ya que al mostrar los mejores resultados de cuantificación de ADN, es de esperar que este valor sea directamente proporcional a la cantidad de inhibidores adheridos al ADN.

Las columnas que cumplieron las mejores condiciones para ser aplicadas en la pericia genética de restos óseos, con el fin de llevar a cabo la concentración y purificación de ADN en la técnica de extracción del FBI, fueron las centricon YM-100 al mostrar los mejores resultados de cuantificación de ADN y por ende en la amplificación de las secuencias recuperadas por PCR (figura 11)

En la desmineralización, se evaluó la efectividad de dos columnas de purificación adicionales a la empleada por el método estándar con el propósito de optimizar la aplicación de este protocolo en análisis posteriores.

La concentración adecuada del ADN fue la primera variable estudiada con la utilización de estos tres métodos, a pesar de que el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las metodologías ($p=0,44$) (anexo 8), las columnas Centricon YM-50 con un diámetro de poro inferior a las otras dos columnas, retienen mayor cantidad de ADN durante el proceso de filtración y por ende presentan un rendimiento superior a estas, tal y como se muestra en la figura 12.

Por otro lado las columnas de Centricon YM-100 son más eficientes que las YM-50 en la purificación de las muestras; sin embargo se aplicó el mismo principio que con los dispositivos de filtración QIAamp; ya que la retención del ADN en las columnas es proporcional a la detención de agregados como compuestos inhibitorios con los ácidos nucleicos en el poro de la membrana (Andelonic *et al*, 2001); es por esto que con las columnas YM-50 se obtuvo mayor rendimiento en la cuantificación y contrariamente el menor rendimiento en la purificación (figura 13); por ende con las columnas centricon YM-50 se requirió tomar medidas para la eliminación o atenuación de los inhibidores, realizando

diluciones en todas las muestras (ver detalle en cuadro 8) con el fin de lograr la amplificación de las mismas.

Los dispositivos de ultrafiltración que cumplieron las mejores condiciones para ser aplicados en la pericia genética de restos óseos con la técnica de extracción por desmineralización, demostraron ser las columnas Centricon YM-50® a causa de que presentaron los mejores resultados en cuanto a la cuantificación del ADN y en la amplificación por PCR de las secuencias recuperadas (figura 14).

CONCLUSIONES

- La desmineralización muestra ser un protocolo prometedor en la extracción de ADN de tejido óseo, mediante este se logró amplificar dos muestras óseas que anteriormente no amplificaban.
- El método de purificación por ultrafiltración empleado después de la extracción de ADN, es determinante para la ejecución de un proceso exitoso en la recuperación y la limpieza de inhibidores del ADN.
- Las columnas de purificación comerciales que tienen mejor rendimiento en la función de concentración del ADN de tejido óseo presentan un poro de 30.000-50.000 Daltons y por tanto en cuanto menor sea el diámetro de poro en las columnas, se evita la pérdida de ADN durante el proceso de ultrafiltración.
- Las columnas comerciales Amicon Ultra-4® presentan un rendimiento inferior a las Centricon YM-100; debido a presentar un fundamento de filtración y funcionamiento diferente.
- El método de extracción mediante el Kit de QIAGEN, es muy efectivo en la purificación de ADN; pero presenta rendimientos inferiores a los obtenidos por los protocolos de FBI y desmineralización en cuanto a la cuantificación y amplificación del ADN recuperado.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el protocolo de desmineralización en sustitución del FBI, prioritariamente para el análisis de muestras difíciles.
- Para realizar el proceso de purificación de ADN en muestras óseas se recomienda la utilización de columnas Centricon YM-30 y 50 de 30.000 y 50.000 Daltons respectivamente con el propósito de lograr una exitosa concentración del ADN y evitar la pérdida de ADN durante el proceso (Goodwin W & Ovchinnikov. 2001).
- Para lograr aumentar los rendimientos obtenidos con la utilización del Kit comercial de QIAGEN se pueden realizar variaciones en el mismo, tales como las recomendadas por investigadores como Andelonic *et al*, 2001.
- Para lograr un rendimiento más eficiente en la amplificación de los extractos, después de realizar el proceso de purificación con columnas YM-30 y YM-50 se recomienda la utilización del Kit MiniElute PCR purification de QIAGEN® (referencia 28006).
- Se recomienda aplicar el protocolo de desmineralización con el reactivo EDTA de Fisher para ADN (referencia: BP2482-500), con el fin de mejorar los rendimientos; debido a que éste se encuentra a una concentración óptima y a la vez es recomendado para trabajar con ADN.
- Realizar pruebas para comprobar la eficiencia del método en el cual se utiliza NaOH para eliminar los inhibidores de Taq Polimerasa (Bourke *et al*, 1999).
- Realizar pruebas de concentración y purificación con columnas de sílica (las cuales son ampliamente recomendadas en numerosas investigaciones).
- No se recomienda la utilización de las Columnas Amicon® Ultra-4 en sustitución de las Centricon® YM-100 en el protocolo del FBI debido a que las primeras presentan un rendimiento muy inferior con respecto a los dispositivos Centricon.

- Realizar una investigación en la cual se contemple la utilización del protocolo de FBI y desmineralización con la utilización de columnas Centricon® YM-30.

BIBLIOGRAFÍA

ANDELONIC S.; MARTÍN P.; SUTLOVIC D.; ERCEG I. 2001. ADN Typing From Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on ADN Isolated from Bone and Teeth Samples. Medical Journal. 42: 260-6.

ARROYO E.; FERNÁNDEZ E.; PÉREZ A.; TURBÓN D. 2003. Anales de la Real Sociedad Española de Química. ADN Antigua Química y Aplicaciones. Disponible en :< dialnet.Unirioja .es /ser vlet/fichero_articulo ?codigo =719047 & orden=0> Consultado el: 30 de Julio, 2008.

BOSCH M.; MARMI J.; FERNANDO A.; LÓPEZ F.; ANDRÉS O.; GARCÍA E.; PONS M.; KELLERMANN T.; GUALLAR B.; BISBAL F.; Domingo X. 2005. Genotipar sin Capturar. Galemys 17 (nº especial): 81-102.

BOURKE M.; SCHERCZINGER C.; LADD C.; LEE.; H. 1999. NaOH Treatment to Neutralize Inhibitors of Taq Polymerase. J forensic Sci. 44 (5): 1046-1050.

CHECA M.; CARLEOS J.; BARO A.; DUNNER S.; CAÑÓN J. 2006. Estimación de frecuencias alélicas en pools de ADN mediante el procesamiento de señales de electroforesis capilar. Disponible en: < http:// acteon .webs .upv .es/docs /poolescanon .PDF >. Consultado el 1 de Noviembre, 2008

Curso Internacional de Genética Forense Haplotipos del Cromosoma Y. Extracción de ADN de muestras óseas difíciles. (I, 2003, Medellín, Colombia). 2003. Universidad de Antioquia- 200 años Marzo 25-28.1140 p.

DAVOREN J.; VANEK D.; KONJHODZIC R.; CREWS J.; HUFFINE E.; PARSONS T. 2007. Highly Effective ADN Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J.* 48: 478-485.

DEL VALLE, C. 2002. Comparación de Tres Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos. Tesis Bach en Ingeniería en Biotecnología, San José de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 91p.

EDSON S.; ROSS J.; COBLE M.; PARSON T.; BARRITT S. 2004. Naming the Dead- Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. *Forensic Sci Rev* 16:63.

FERNÁNDEZ, E. 2000. Polimorfismos de ADN mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea. Tesis Doctorado en Biología, Barcelona, España. Universidad de Barcelona. 144p.

FERNÁNDEZ N. 2006. Pliego de condiciones licitación por registro N° 2006-LG-000026-PROV. “compra de un analizador genético”. Disponible en: <-<http://www.poderjudicial.go.cr/proveeduria/archivos/licitaciones/2006-LG-000026-PROV.DOC>>.

Consultado 9 de Octubre 2008.

FRIAS I.; LÓPEZ M.; PRIETO V.; PLATA A.; TORRES Y. 2007-2008. Curso de Capacitación on line de Genética Forense. Identificación de ADN en huesos y piezas dentales. Universidad de Zaragoza. Capítulo 2.2

GOODWIN W & OVCHINNIKOV I. 2001. The Isolation and Identification of Neandertal Mitochondrial ADN. Promega. Disponible en: [www. promega. Com / profiles /402/profilesindna_402_09.pdf](http://www.promega.com/profiles/402/profilesindna_402_09.pdf). Consultado el 28 de Noviembre del 2008.

GONZÁLEZ, R. FERREIRA, A. NORIS, K., FEIJOO, J. 2008. Caracterización de la interacción colágeno-hidroxiapatita. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(3) : 300-302.

GUZMÁN L. 2007. PCR en tiempo real. Disponible en: < <http://www.inen.sld.pe/genetica/eventos/Invitacion-PCR-RT.pps#256,1>, PCR en Tiempo Real. Consultado 21 de Noviembre 2008.

HOCHMEISTER, M.; BUDOWLE B.; BORER U.; EGGMANN U.; COMEY C.; DIRNOHOFER R.1991. Typing of Deoxyribonucleic Acid (ADN) Extracted from Compact Bone from Human Remains. . J Forensic Sci.

JIMÉNEZ, G & MORERA, B. 2007. Revisión sobre la extracción de ADN a partir de huesos humanos. Universidad de Barcelona, España. Disponible en: < criminalistic.org/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=176>. Consultado el: 19/07/08.

LOREILLE O.; DIEGOLI T.; IRWIN J.; COBLE M. ; PARSONS T. 2007. High efficiency ADN extraction from bone by total desmineralization. Forensic Science International: Genetics 1 191-195.

LORENTE J.; NAVARRETE L.; ROSAS G.; VEGA M. 2007. Genética forense, la Ciencia al Servicio de la Justicia. Disponible en: < www.criminalistica.net/forense/hemeroteca/adn/genetica-forense-al-servicio-de-la-justicia.html >

MORAGA M.; ASPILLAGA E.; SANTORIO C.; STANDEN V.; CARVALLO P.; ROTHHAMMER F. 2001. Análisis de ADN mitocondrial en momias del norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas. Revista Chilena de Historia Natural. 74: 719-726.

MARTÍN P. 2007. La Identificación Genética de Restos Cadavéricos. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses Departamento de Madrid. Disponible en: www.fgr.cu/Legislacion/Estudios%20Juridicos%20Espa%F1a/MEDICOS/MEDI22.pdf . Consultado 1 de Diciembre 2008.

PÄÄBO, S; HIGUCHI R.G Y WILSON A. 1989. Ancient ADN and the polymerase chain reaction. J. Biol. Chem. Pag 264.

PRIETO L. 2007. Aplicaciones Forenses del ADN. Comisaría General de Policía Científica Laboratorio de ADN. Disponible en: www.uam.es/personal_pdi/ciencias/gpepe/g_forense/aplicaciones_forenses_del_adn.pdf . Consultado 1 de Diciembre 2008.

SÁEZ, C.; CALVO J.; MARTÍNEZ J.; GAYA A. 2004. Extracción de proteína ligada a la matriz ósea: descripción de una técnica sencilla de extracción de BMP2 a partir de hueso de banco congelado. Patología del aparato locomotor, 2(3): 167-175

ANEXOS

Anexo 1. Entidades Internacionales participantes en el estudio del tema de la extracción de ADN de restos óseos por el laboratorio SWGDAM del FBI ADN U II, 2501 Investigación Parkway, Quantico, VA 22135:

- Arizona Department of Public Safety Crime Laboratory, Phoenix, AZ
- Armed Forces ADN Identification Laboratory, Rockville, MD
- California Department of Justice, Jan Bashinski ADN Laboratory, Richmond, CA
- Connecticut Department of Public Safety, Forensic Science Laboratory, Meriden, CT
- Fairfax Identity Laboratories, Richmond, VA
- Federal Bureau of Investigation, ADN U II Quantico, VA
- Hong Kong Government Laboratory, Forensic Science Division, Hong Kong, China
- Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Servicio de Biología, Madrid, Spain
- Lab Corp, Forensic Identity Department, Research Triangle Park, NC
- Laboratoire Identification Genetique, Institut National de Criminalistique et de Criminologie, Brussels, Belgium
- Michigan State University, School of Criminal Justice, East Lansing, MI
- Minnesota Bureau of Criminal Apprehension Forensic Science Laboratory, St. Paul, MN
- Mitotyping Technologies, State College, PA
- Molecular World, Thunder Bay, Ontario
- New Jersey State Police Office of Forensic Sciences, Hamilton, NJ
- North Louisiana Crime Laboratory, Shreveport, LA
- Office of the Chief Medical Examiner, Department of Forensic Biology, New York, NY
- Unidad de Genética Forense, Sección de Bioquímica, Complejo de Ciencias Forenses, San Joaquín de Flores, Costa Rica
- University of North Texas Health Science Center, ADN Identity Laboratory, Fort Worth, TX.

Anexo 2. Representación esquemática de columnas Centricon® y Amicon® Ultra-4

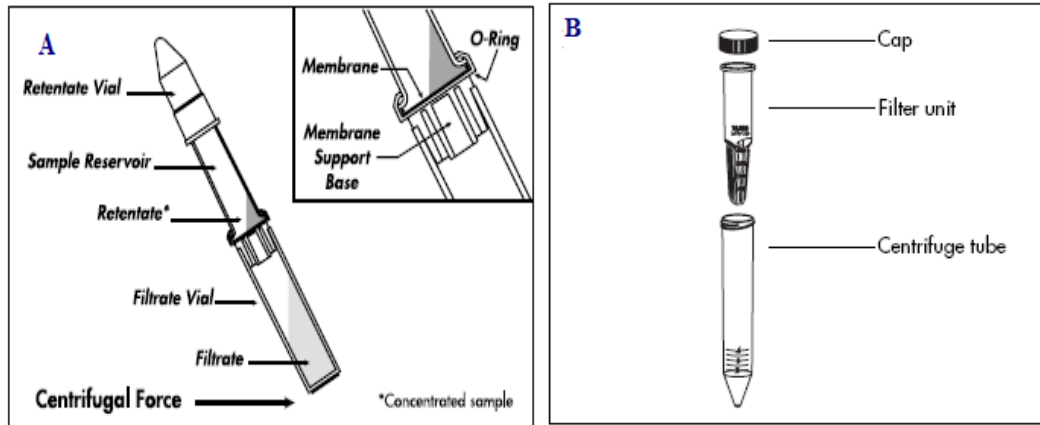


Figura 16. A. Diagrama de Centricron® YM-100 y YM- 50⁴ y B. diagrama de Amicon® Ultra-4⁵

En la figura 18 se muestran las columnas utilizadas para la ultrafiltración, con membranas de celulosa como Centricron® YM-50 y YM-100 presentan el mismo modelo y fundamento de uso (con 3 depósitos diferentes que se ensamblan según la metodología recomendada por el fabricante), Las columnas Amicon® Ultra-4 10K se utilizan en el mercado en sustitución de las columnas Centricron® YM-100.

⁴ MILIPORE 2000. Centricron® Centrifugal Filter Devices User Guide

⁵ MILIPORE 2003. Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices User Guide

Anexo 3. Representación esquemática de un ensayo RT-PCR usando el método Taqman®.

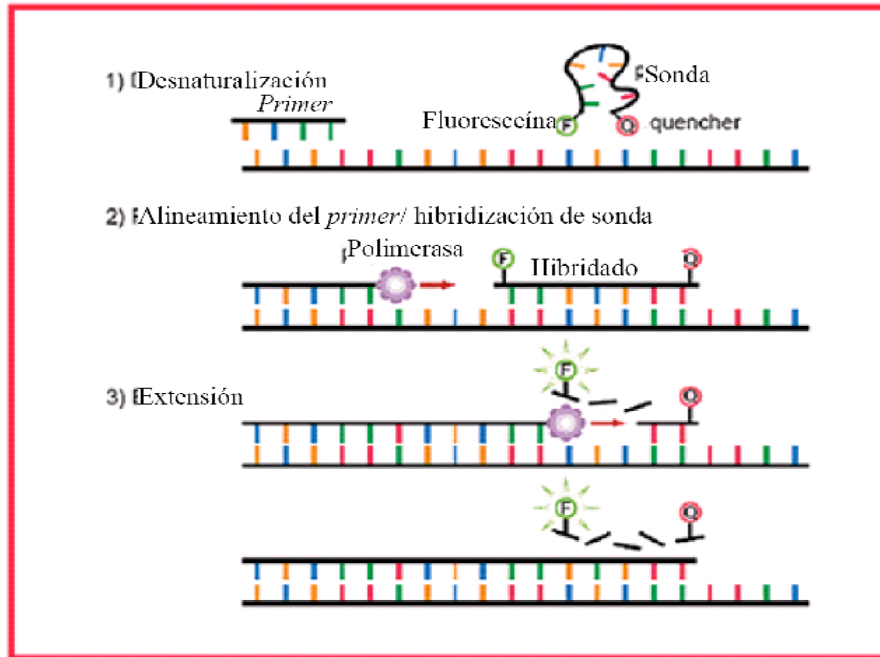


Figura 17. Representación esquemática del proceso de PCR Tiempo Real.
Fuente: Fernández, 2000.

Como se muestra en la figura anterior en el paso 1) la sonda se une al extremo 5' y al extremo 3', 2) si la secuencia de ADN complementaria a la sonda está presente se hibridan, 3) la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador y degrada la sonda gracias a la actividad 5' nucleasa, esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen y esto produce un incremento de la fluorescencia. El número de moléculas de ADN cuantificadas es proporcional a la intensidad de la fluorescencia emitida.

Anexo 4. PCR mediante el Kit AmpFISTR® Identifiler™

Cuadro 9. Descripción de la PCR mediante la utilización del Kit comercial identifiler™.

Marcador	Localización en el cromosoma	Alelos incluidos en escalera alélica de identifiler™	Colorante fluorescente	Control de ADN 9947A
D8S1179	8	8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19	6-FAM	13 ^a
D21S11	21q11.2-q21	24,24.2,25,26,27,28,28.2,29,29.2,30,30.2,31,31.2,32,32.2,33,33.2,34,34.2,35,35.2		30 ^b

		,36,37,38		
D7S820	7q11.21-22	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15		10,11
CSF1PO	5q33.3-34	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15		10,12
D3S1358	3p	12,13,14,15,16,17,18,19	VIC	14,15
Th01	11p15.5	4,5,6,7,8,9,9.3,10,11,13.3		8,9.3
D13S317	13q22-31	8,9,10,11,12,13,14,15		11 ^c
D16S539	16q24-qter	5,8,9,10,11,12,13,14,15		11,12
D2S1338	2q35-37.1	15,16,17,18,19,20,21,22,23 ,24,25,26,27,28		
D19S433	19q12-13.1	9,10,11,12,12.2,13,13.2,14, 14.2,15,15.2,16,16.2,17,17. 2	NED	14,15
vWA	12p12-pter	11,12,13,14,15,16,17,18,1, 9,20,21,22,23,24		17,18
TPOX	2p23-2PER	6,7,8,9,10,11,12,13		8 ^d
D18S51	18q21.3	7,9,10,10.2,11,12,13,13.2,1 4,14.2,15,16,17,18,19,20,2 1,22,23,24,25,26,27		15,19
Amelogenina	X :p22.1-22.3 Y : p11.2	X,Y	PET	X
D5S818	5q21-31	7,8,9,10,11,12,13,14,15,16		11 ^e
FGA	4q28	17,18,19,20,21,22,23,24,25 ,26,26.2,27,28,29,30,30.2,3 1.2,32.2,33.2,42.2,43.2,44. 2,45.2,46.2,47.2,48.2,50.2, 51.2		23,24

Anexo 5. Corte de fragmentos de hueso realizado previo a la a la trituración.

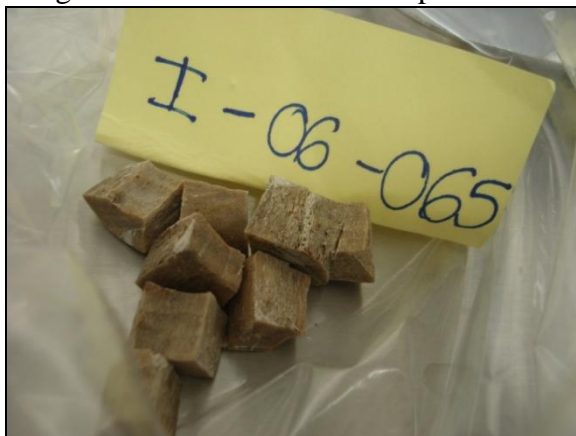


Figura 18. Fragmentos de hueso listos para pulverizar.
Fuente: Laboratorio de Genética Forense del OIJ, 2008.

Anexo 6. Modificaciones realizadas al proceso de desmineralización.

- Tomar de 0.6- 1.21 g de polvo de hueso en un tubo cónico de 15ml.
- Incubar con 9-18 ml de buffer de extracción (0.5 M EDTA, 1% de laurel-sarcosinato + 200 µl de pK (20 mg/ml) un shaker rotatorio a 56°C
- Sacar el sobrenadante y pasar a otro microtubo o cónico (según el volumen).
- Agregar igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), y agitar 30s
- El sobrenadante es concentrado usando columnas con unidades de (Centricon 30 (30kDa), Amicon® Ultra-15
- Realizar tres lavados con agua (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen)
- Volumen final 100 µl
- Muestra está lista para PCR (almacenar a 4°C) (Loreille *et al*, 2007)

Según recomendaciones del autor Loreille *et al*, 2007 el compuesto utilizado para la desmineralización es EDTA (HOOCCH₂)₂ NCH₂ CH₂N (CH₂COOH)₂, C₁₀H₁₆N₂O₈ F.W. 292.25, para trabajar con ADN, el cual no fue utilizado en éste trabajo, así mismo la sugerencia de Loreille *et al* con respecto a el empleo de columnas es Centricon® YM-30; y las columnas utilizadas en este trabajo fueron las Centricon® YM-50, las cuales fueron seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad y a que presentan un diámetro de poro similar (Loreille *et al*, 2007).

Anexo 7. Diagrama de aplicación del KIT de QIAGEN

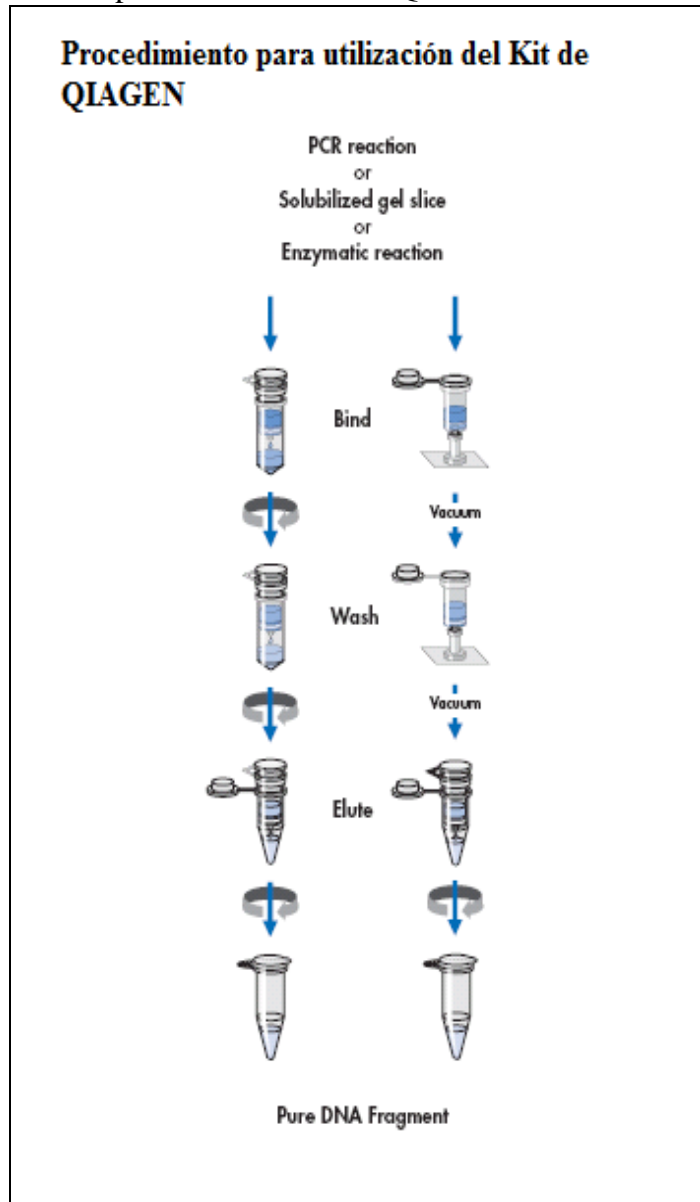


Figura 19. Representación esquemática para la aplicación del Kit de QIAGEN⁶

⁶ QIAquick Spin Hand boock 2002.

Anexo 8. Estadística

Cuadro 10. Resumen de análisis de varianza de la cuantificación de ADN de 11 muestras de tejido óseo mediante la aplicación de tres metodologías de extracción de ADN.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado	F 5%	F 1%
Tratamiento	2	10358,23	5179,11	1,04	3.32	5.39
Error	30	349758,95	11658,6317			
Total	32	360117,18	16837,75			

R/ Se acepta la H_0 , debido a que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

Cuadro 11. Resumen de análisis de varianza de la cuantificación de ADN de 11 muestras de tejido óseo mediante la aplicación de tres metodologías de purificación de ADN en el protocolo de desmineralización.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado	F 5%	F 1%
Tratamiento	2	19106,6169	9553,30843	0,44	3.32	5.39
Error	30	275538,185	9184,60618			
Total	32	294644,802	18737,9146			

R/ Se acepta la H_0 , debido a que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

Cuadro 12. Resumen de análisis de varianza de la cuantificación de ADN de 6 muestras de tejido óseo mediante la aplicación de tres metodologías de purificación de ADN en el protocolo del FBI.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado	F 5%	F 1%
Tratamiento	2	7285,93161	3642,96581	1.00	3.55	6.01
Error	18	65329,0451	3629,39139			
Total	20	72614,9767	7272,3572			

R/ Se acepta la H_0 , debido a que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos

Anexo 9. Alcances del analizador genético ABI Prism 3130®.

- Detecta marcadores múltiples.
- Tanto el polímetro como las muestras se cargan automáticamente.

- Los marcadores fluorescentes son excitados y detectados por un láser de ión argón.
- Con escogencia de automuestreador para 96 tubos o placa de microtítulos de 384 pozos, seleccionamos en nuestro caso 96 well Plate kit 3130 series Applied Biosystems 4316451
- Con control de temperatura del capilar desde 18 a 65 grados centígrados.
- Con celda de detección de calor, para mejorar el control térmico.
- Puede trabajar con diferentes técnicas de marcado fluorescente y detectar al menos 5 fluorocromos diferentes simultáneamente
- El sistema de detección se realiza por monitoreo de la fluorescencia con cámara CCD con un rango de longitud de onda de 488 a 514.5nm
- Con un sistema de distribución del polímero que elimina la necesidad del llenado por jeringa, el mantenimiento y la limpieza. Con llenado automático de capilares antes de cada corrida con polímero fresco que cubre la pared del capilar eliminando el flujo electro osmótico.
- Con celda de detección del calentamiento y módulos optimizados para el 3130 POP-7 para la generación de resultados más consistentes y datos de mayor calidad.
- Un polímero y un array con mayor funcionalidad tanto para secuenciación como para análisis de fragmentos, haciendo posible para el usuario cambiar fácilmente entre corridas de secuenciación y de análisis de fragmentos. (Fernández N, 2006

Anexo 10. Proceso mediante el cual a medida que la fase mineral del hueso disminuye, el porcentaje de masa retenida por la hidroxiapatita se reduce.

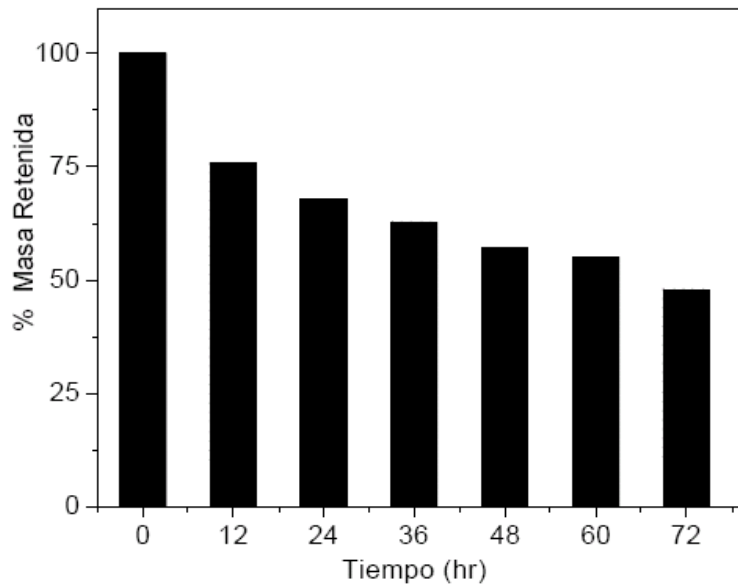


Figura 20. Masa retenida (%) en función del tiempo de desmineralización.
Fuente: González *et al*, 2008.

En la figura anterior se observa como cada 12 horas el contenido mineral disminuye gradualmente, mostrando a las 72 horas una pérdida del 52% de la masa inicial, esta pérdida de masa se atribuye completamente a la hidroxiapatita.

Anexo 11. Proceso de desmineralización en función del volumen de solución ácida utilizada.

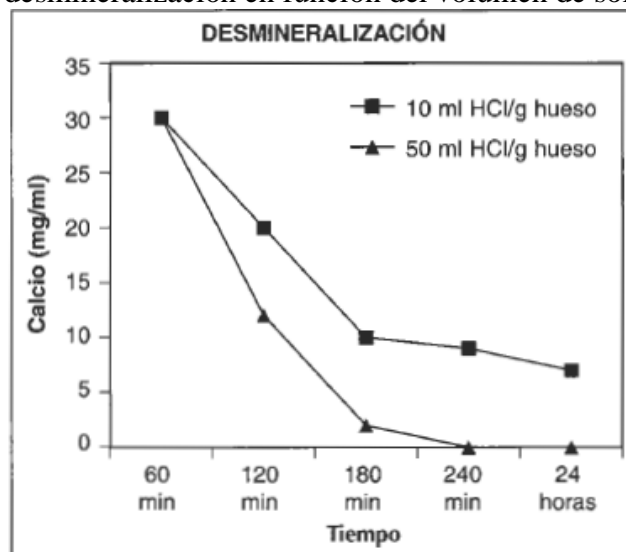


Figura 21. Influencia del volumen de la solución de lavado en el proceso de desmineralización.
Fuente: Sáez *et al*, 2004.

En la figura 23 se representa las diferencias en el proceso de desmineralización en función del volumen de solución de lavado. Se aprecia claramente como al emplear menor proporción de EDTA 0.5 M, la cantidad de calcio extraída con el lavado se ve limitada por el grado de saturación de la solución resultante, de este modo con 10ml de solución ácida por gramo de matriz ósea inicial, a las 24 horas todavía queda abundante calcio en los sobrenadantes de los lavados y el proceso debe alargarse en el tiempo. Por el contrario, una proporción de 50 ml de EDTA 0.5M para la misma cantidad de hueso se muestra capaz de extraer todo el calcio (Sáez *et al*, 2004).