



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

INFLUENCIA DEL PROCESO TAFONÓMICO EN LA OBTENCIÓN DE ADN A  
PARTIR DE TEJIDO ÓSEO HUMANO PROVENIENTE DE FOSAS  
CLANDESTINAS UTILIZANDO TRES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN  
MOLECULAR

**Línea de investigación:**

**Biología celular y molecular**

Trabajo Académico para optar el título de segunda especialidad en  
Genética y Biología Molecular

**Autora:**

Portuguéz Ramírez, Lucero Illariy

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

Rodrigo Rojas, María Elena

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

**Lima - Perú**

**2021**

**Referencia:**

Portuguéz, L. (2021). *Influencia del proceso tafonómico en la obtención de ADN a partir de tejido óseo humano proveniente de fosas clandestinas utilizando tres metodologías de extracción molecular* [Trabajo académico de segunda especialidad, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5286>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | Vicerrectorado de  
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

“INFLUENCIA DEL PROCESO TAFONÓMICO EN LA OBTENCIÓN DE ADN A  
PARTIR DE TEJIDO ÓSEO HUMANO PROVENIENTE DE FOSAS CLANDESTINAS  
UTILIZANDO TRES METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN MOLECULAR”

Línea de investigación: Biología Celular y Molecular

Trabajo Académico para optar el Título de Segunda Especialidad en Genética y Biología

Molecular

**AUTORA**

Portuguéz Ramírez, Lucero Illariy

**ASESOR**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**JURADO**

Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio  
Rodrigo Rojas, María Elena  
Scotto Espinoza, Carlos Jesús

Lima – Perú

2021

## Tabla de Contenido

Lista de Tablas .....	4
Lista de Figuras .....	5
Resumen .....	6
Abstract.....	7
<b>I. Introducción .....</b>	<b>8</b>
1.1. Descripción del Problema .....	10
1.2. Antecedentes .....	133
1.3. Objetivos .....	144
1.3.1. Objetivo General.....	144
1.3.2. Objetivos Específicos.....	144
1.4. Justificación.....	155
1.5. Impactos Esperados del Trabajo Académico .....	166
<b>II. Metodología .....</b>	<b>177</b>
2.1 Población y Muestra.....	188
2.2 Procedimientos .....	21
2.2.1 Selección de las Muestras .....	21
2.2.2 Pre-Tratamiento del Hueso .....	233
2.2.3 Pulverización de Muestras Óseas Antiguas .....	277
2.2.4 Digestión con Solución de Lisis .....	30
2.2.5 Extracción de ADN a partir de Tejido Óseo Antiguo.....	31
2.3. Método de Análisis.....	366
2.3.1. Cuantificación por PCR en Tiempo Real.....	366
2.3.2. Purificación del ADN .....	377
2.3.3. Posibles Inhibidores de la PCR.....	399
<b>III. Resultados .....</b>	<b>40</b>
3.1 Cantidad de Hueso Pulverizado para la Extracción de ADN.....	40
3.2 Comparación de las Tres Metodologías de Extracción de ADN a Partir de Restos Óseos Antiguos. ....	41
3.3 Cantidad de ADN por PCR en Tiempo Real.....	444
3.4 Eliminación de inhibidores.....	466
<b>IV. Conclusiones .....</b>	<b>50</b>
<b>V. Recomendaciones.....</b>	<b>51</b>
<b>VI. Referencias.....</b>	<b>53</b>
<b>VII. Anexos.....</b>	<b>577</b>
<b>Anexo A. Glosario de Términos.....</b>	<b>588</b>

<b>Anexo B. Manuales Revisados.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo C. Lista de Abreviaturas y Símbolos .....</b>	<b>62</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1</b> Principales instrumentos y equipos empleados en la presente investigación .....	20
<b>Tabla 2</b> Regiones de interés en la cuantificación por PCR en tiempo real mediante el Kit Quantifiler Duo DNA .....	377
<b>Tabla 3</b> Cantidad inicial de pulverizado óseo para la obtención de ADN .....	40
<b>Tabla 4</b> Promedio de la concentración de ADN en muestras óseas antiguas procesadas por diferentes métodos .....	422
<b>Tabla 5</b> Resultados de la cuantificación de ADN por PCR en tiempo real a partir de restos óseos antiguos .....	422

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> Muestra ósea antigua que llega al LABIMOG.....	23
<b>Figura 2</b> La muestra aperturada puede ser un hueso completo o un fragmento de hueso .....	23
<b>Figura 3</b> Se corta un fragmento de 6 a 7 cm de longitud del hueso seleccionado .....	25
<b>Figura 4</b> Con ayuda del bisturí se procede a retirar el tejido blando de la superficie.....	25
<b>Figura 5</b> Se retira la suciedad y tejido blando del interior del fragmento óseo .....	26
<b>Figura 6</b> Lavado de los fragmentos óseos.....	26
<b>Figura 7</b> Se enjuaga con agua ultra pura y etanol absoluto. Secado a temperatura ambiente	27
<b>Figura 8</b> Se envuelve el fragmento óseo en papel estéril y se lleva al horno a 60 °C.....	27
<b>Figura 9</b> Con vestimenta apropiada y dentro de una cabina de bioseguridad.....	28
<b>Figura 10</b> Se retira la capa superficial con ayuda del Dremel y se pulveriza el hueso.....	29
<b>Figura 11</b> El polvillo obtenido se almacena y rotula en un tubo Falcon de 50 ml .....	29
<b>Figura 12</b> Se pesa la cantidad necesaria del polvillo obtenido para la extracción del ADN ..	30
<b>Figura 13</b> Descalcificación y/o desmmineralización, según el método de extracción .....	32
<b>Figura 14</b> Se agregan los buffers al ADN colectado para su purificación.....	38
<b>Figura 15</b> Centrifugación de los extractos de ADN en columnas de sílica .....	38
<b>Figura 16</b> Porcentaje de cuantificación de ADN por PCR en tiempo real utilizando tres metodologías de extracción.....	46
<b>Figura 17</b> Pocentaje de cuantificación de ADN por PCR en tiempo real utilizando los dispositivos de concentración y/o purificación.....	47
<b>Figura 18</b> Porcentaje de muestras que presentan inhibidores con las metodologías analizadas.....	49

## Resumen

Los estudios genéticos y moleculares en restos óseos antiguos de interés forense son cada vez más frecuentes y se basan en técnicas de extracción del ADN, las cuales emplean metodologías complejas que deben enfrentarse a muestras poco conservadas con serios problemas como la degradación, la limitada cantidad de ADN y la presencia de inhibidores. El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de comparar tres metodologías de extracción de ADN y evaluar la eficiencia en la obtención de ADN nuclear útil para casos forenses, mediante la técnica de PCR. Se evaluó la cantidad de ADN, la presencia de inhibidores y la procedencia de las muestras con cada metodología de extracción analizada: el método orgánico, el de desmineralización con las recomendaciones de la ICMP y el que emplea el Kit comercial QIAamp DNA Investigator de QIAgen®, los mismos que requieren procedimientos distintos para la digestión y descalcificación de la muestra ósea. Se analizaron 119 muestras recuperadas de lugares de entierro clandestinos en diferentes contextos tafonómicos y expuestas a mecanismos deteriorantes: impacto ácido, alcalino y microbiano. Los extractos de las muestras fueron cuantificados, evidenciando la cantidad de ADN e inhibidores, con estos resultados se obtuvieron diferencias y similitudes entre las metodologías, demostrando que el protocolo de desmineralización obtuvo los mejores resultados de cuantificación. Asimismo, se pudo comprobar que el tamaño del poro de las columnas de purificación y los dispositivos de ultrafiltración son necesarios para obtener ADN con el éxito deseado.

*Palabras clave:* desmineralización, deteriorante, tafonómico, impacto

## Abstract

Genetic and molecular studies on ancient skeletal remains of forensic interest are increasingly frequent and are based on DNA extraction techniques, which use complex methodologies that must face poorly preserved samples with serious problems such as degradation, the limited amount of DNA and the presence of inhibitors. The present work was developed with the purpose of comparing three DNA extraction methodologies and evaluating the efficiency in obtaining nuclear DNA useful for forensic cases, using the PCR technique. The amount of DNA, the presence of inhibitors and the origin of the samples were evaluated with each extraction methodology analyzed: the organic method, the demineralization method with the recommendations of the ICMP and the one used by the QIAamp DNA Investigator commercial Kit of QIAgen®, the same ones that require different procedures for the digestion and decalcification of the bone sample. We analyzed 119 samples recovered from clandestine burial sites in different taphonomic contexts and exposed to deteriorating mechanisms: acid, alkaline and microbial impact. The extracts of the samples were quantified, evidencing the amount of DNA and inhibitors, with these results differences and similarities between the methodologies were obtained, demonstrating that the demineralization protocol obtained the best quantification results. Likewise, it was also found that the pore size of purification columns and ultrafiltration devices are necessary to obtain DNA with the desired success.

*Keywords: demineralization, deteriorating, taphonomic, impact*

## I. INTRODUCCIÓN

Con el transcurrir del tiempo, han aparecido diversas técnicas biológicas para la identificación e individualización de personas. Dentro de las técnicas más usadas se encuentran las huellas dactilares, identificación odontológica, antropológica y los exámenes de grupos sanguíneos (Hirszfeld y Hirszfeld, 1919).

Hoy en día, gracias al desarrollo científico, es posible la aplicación de nuevas tecnologías, como la técnica del ADN, que gradualmente ha ido profundizando en su capacidad de identificación sobre indicios cada vez más pequeños, muchas veces imperceptibles e incluso sobre aquellas muestras antiguas y degradadas.

Cuando se habla de ADN en el campo de la ciencia forense, cualquier indicio puede resultar de gran importancia en un caso determinado, sobre todo en los hechos de crímenes violentos, donde los indicios biológicos son los más trascendentes, tanto por su significado como por la información que ellos puedan brindar mediante este análisis.

El establecer métodos que garanticen la identificación humana dentro de un determinado grupo o población de individuos, hace que el análisis del ADN no sólo se realice con la debida responsabilidad, sino que además se deben de considerar ciertas condiciones que surgen en el laboratorio, en el lugar de los hechos y de la escena en la que estos ocurrieron, las cuales deben ser claras para poder interpretar algunos resultados que inicialmente no tendrían lógica, y de esta manera podrán ser resueltos y hacer posible el análisis de los múltiples indicios que se suelen remitir al Laboratorio, sobre todo de las muestras antiguas y/o en severo estado de degradación, siendo imprescindible la fluida comunicación entre el Laboratorio y todos aquellos que de una u otra forma han participado en la investigación.

En genética forense, los cadáveres esqueletizados representan los casos más problemáticos en cuanto a su identificación genética cuya única muestra aprovechable son los huesos y dientes (Martín, 2007).

Cuando se trabaja con muestras degradadas y poco conservadas es importante tener presente diversos factores que influyen en los resultados, tales como el tiempo de exposición al ambiente, los inhibidores que puedan estar presentes, el tiempo de preservación, la intervención de los profesionales de distintas áreas (desde la colecta de la muestra hasta el procesamiento de la misma) y sobre todo las metodologías de extracción de ADN, las que son decisivas a la hora de obtener los resultados.

En el presente trabajo se utilizó tres metodologías para extraer el ADN a partir de restos óseos antiguos (1980 al 2000); un método de extracción orgánica que emplea fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, el de desmineralización con las recomendaciones de la ICMP (Loreille et al., 2007), y una metodología de extracción que se basa en el aislamiento de ADN total empleando el kit comercial de extracción para huesos y dientes de QIAgen®.

En la etapa de purificación del ADN se emplearon los dispositivos de ultrafiltración establecidos en cada protocolo, tales como las columnas de Centricon® en la de extracción orgánica, las columnas Amicon® en el de desmineralización y las columnas QIAamp® utilizadas en el Kit comercial QIAgen®.

En tal sentido, el presente estudio se realizó con la finalidad de elegir el protocolo de extracción que reúna las mejores condiciones para extraer el ADN de muestras óseas antiguas con una mayor calidad y cantidad, resultando reproducible para llevar a cabo posteriores análisis, así como evaluar la reducción de inhibidores con los diferentes dispositivos empleados en la etapa de purificación. Con ello se pudo mejorar ciertas debilidades y complementar las fortalezas de las metodologías de extracción empleadas por el Laboratorio de Biología Molecular y Genética (LABIMOG); así como minimizar recursos y estandarizar los procedimientos, una vez establecidos, ante este tipo de muestra de difícil manejo.

## 1.1. Descripción del problema

La paleontología tiene como disciplina principal a la tafonomía, la cual se encarga principalmente de reconstruir los diversos sucesos ocurridos en el pasado, para ello analiza los procesos naturales y culturales que perturban y modifican a la materia orgánica, procedente de los diferentes ambientes en los que han sido enterrados o depositados (Stiner, 2008). Estos procesos son aquellos que sucedieron antes, durante y después de que un organismo ha sido enterrado.

Es así que, la tafonomía se comporta como una ciencia interdisciplinaria y de gran ayuda para arqueólogos, antropólogos, biólogos y profesionales forenses, donde la tafonomía resulta ser una esencial herramienta para los estudios de alteraciones post mortem originadas por distintos tipos de agentes físicos y/o biológicos (Dirkmaat, 2008).

En los últimos años, la mencionada ciencia ha adquirido considerable importancia en cuanto a las técnicas y metodologías empleadas en el desarrollo de los análisis de interés forense, siendo notorios los avances realizados en esta disciplina, buscando siempre enfatizar la comprensión de los procesos tafonómicos, sobre todo la descomposición cadavérica y la participación de distintas especies de insectos y animales en este proceso (Backwell et al., 2012; Huchet et al., 2013).

Es necesario mencionar que las muestras que resisten con mayor facilidad los fenómenos de descomposición cadavérica y que mantienen su estructura celular lo más intacta posible son los restos óseos y las piezas dentales (Martín, 2007).

En tal sentido, la tafonomía forense, se ha constituido como una disciplina idónea, teniendo como sus principales objetivos el llegar a establecer el tiempo que dista desde el momento del deceso; plantear los posibles hechos ocurridos antes y después de la muerte; así como lograr diferenciar los efectos que resulten del mismo comportamiento del ser humano, de aquellos ocasionados por los propios procesos biológicos, físicos y químicos; además de los

procesos geológicos característicos de cada tipo de suelo (Haglund y Sorg, 1997). Cabe mencionar que los microorganismos que interactúan con el tipo de suelo en el que se hallan enterrados los restos óseos, llegan a asociarse con éstos ocasionando ciertas modificaciones vinculadas mayormente a los procesos de bioerosión y biodegradación, entre otros.

La tafonomía forense tiene por objetivo final identificar todos aquellos agentes tafonómicos que inciden sobre los restos humanos analizados para centrarse sólo en los que se vinculan con la intervención humana, los mismos que llegan a tener una connotación forense, debido a que no se puede iniciar la reconstrucción de los factores peri mortem hasta que los factores post mortem lleguen a determinarse (Lloveras et al., 2016).

En el Perú, la violencia armada de la década del 80 trajo como resultado alrededor de 16,000 personas desaparecidas, principalmente en zonas rurales del país. Desde el año 2002, las investigaciones antropológico-forenses han logrado la recuperación de cientos de cuerpos humanos que fueron depositados alrededor de 25 años atrás. En Latinoamérica se hicieron necesarias las exhumaciones y la identificación de los cuerpos por desapariciones forzadas vinculadas al terrorismo o dictaduras (Panizo, 2012; González et al., 2014). Diferentes regiones en el mundo han experimentado este tipo de violencia armada, requiriendo la identificación de miles de cuerpos recuperados de fosas clandestinas debido a razones humanitarias y/o jurídicas.

En la medida que se agoten las posibilidades de identificación de los métodos no genéticos, la tecnología del ADN ha demostrado que es una herramienta alternativa para la identificación de restos óseos humanos. Sin embargo, la combinación de ambos criterios potencia ciertamente la identificación. Ante ello, un problema evidente para el uso de la genética en estos casos, es el estado de conservación de las muestras óseas antiguas, debido a que se dificulta la extracción con insuficiente cantidad y calidad del ADN. Por lo general, el impacto del intervalo postmortem en muestras óseas antiguas es severo a consecuencia de los cambios diagenéticos que puede sufrir la estructura química y orgánica del hueso (Parra, 2007).

Este proceso tafonómico se origina por las condiciones ambientales en la que se encuentra sometido el tejido óseo, tales como la humedad, pH de la tierra y agentes microbianos como los hongos que tienden a invadir y proliferar en las estructuras óseas (Lorente, 2001).

Otro punto importante son los inhibidores de la PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa*) los cuales complican aún más el panorama genético de la muestra. Ciertamente, la remoción de los inhibidores de la PCR (colágeno, iones de calcio, grupo hemo, ácidos húmicos, úrea, entre otros), resulta ser un paso crítico cuando se trabaja con material óseo. Desde inicios de la década de los años 90 se han producido esfuerzos para optimizar los niveles de extracción y purificación del ADN óseo en muestras degradadas y contaminadas; desde entonces se han publicado diferentes modelos para lograr optimizar este cometido.

Actualmente, existen diferentes metodologías de extracción del ADN, sin embargo, su extracción a partir de muestras óseas resulta ser compleja, de larga duración y sensible a ciertos inconvenientes como la contaminación, rápida degradación, etc. Por ello, se debe tener especial cuidado en elegir el protocolo de extracción adecuado y de esta manera maximizar tanto la calidad como la cantidad de ADN en este tipo de muestras. Por esta razón, el presente trabajo plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Al evaluar la influencia del proceso tafonómico, mediante el uso de tres metodologías de extracción molecular a partir de tejido óseo humano antiguo, se establecen diferencias en cuanto a la calidad y cantidad del ADN obtenido?

## 1.2. Antecedentes

Considerando el ámbito nacional e internacional, una vez terminado los eventos de violencia social, de guerra y crímenes contra la humanidad, suele transcurrir mucho tiempo, a partir del depósito de los cuerpos en fosas clandestinas donde han sido enterrados, hasta que se dé inicio a la investigación por la desaparición forzada de los individuos que resultaron torturados por dicha violencia, mediante la aplicación de técnicas forenses. La literatura presenta diferentes investigaciones vinculadas a la búsqueda de personas desaparecidas y al desarrollo de técnicas de biología molecular para individualizar los cuerpos y restos óseos enterrados (Alonso et al., 2001; Andelinovic et al., 1994; Brkic et al., 2000; Holland et al., 1993; Huffine et al., 2001; Primorac et al., 1996).

En este trabajo de investigación, el principal problema se focaliza en la capacidad de la metodología para obtener ADN en función de la cantidad y calidad en restos óseos expuestos a una diversidad de factores deteriorantes (Collins et al., 2002). Así, el ADN antiguo desde sus inicios avivó el interés de la comunidad científico forense, donde grupos de investigadores en los años 90 publicaron resultados de gran importancia a partir de muestras biológicas de millones de años de antigüedad (Golenberg et al., 1996; Woodward et al., 1994). Posteriormente, poco tiempo transcurrió para que se demostrara que el ADN se degrada desde el momento en que un determinado individuo muere y que en buenas condiciones puede ser conservado, aunque dañado, durante un máximo de 100.000 años (Lindahl, 1993), permitiendo una escasa recuperación del material genético, pero de gran valor para la investigación.

El Perú es uno de los países de Latinoamérica, duramente golpeado por estos sucesos de violencia social, que se ha visto obligado a realizar un gran número de excavaciones arqueológicas con fines exclusivamente forenses, cuyos hallazgos afianzan la intervención del impacto tafonómico, debido a que los cuerpos fueron encontrados en completo estado de osificación y en su mayoría afectados drásticamente. En tal sentido, el efecto de tal impacto

resultó ser un factor negativo, ya que impide obtener ADN a partir de restos óseos antiguos, esto se pudo verificar cuando se utilizó metodologías de extracción tradicionales para este tipo de muestras.

Indudablemente, los análisis de ADN mediante la aplicación de metodologías de biología molecular asumen un sorprendente protagonismo. Sin embargo, no se tiene mucho conocimiento científico sobre el nivel de influencia del impacto tafonómico en la obtención de ADN a partir de muestras óseas severamente afectadas por dicho impacto. A pesar de ello, en nuestro país, existen estudios donde se correlaciona el éxito de obtención de perfiles genéticos de restos óseos con una metodología establecida para casos de restos humanos que han sido expuestos al fuego (Iannacone et al., 2008; Tito et al., 2004).

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Evaluar la influencia del proceso tafonómico en la obtención de ADN a partir de tejido óseo humano proveniente de fosas clandestinas utilizando tres metodologías de extracción molecular.

#### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Establecer la cantidad de muestra adecuada para los tipos de ambiente en los que se encuentran los restos óseos.
- Determinar la cantidad del ADN extraído y evaluar su calidad a través de la técnica de PCR en Tiempo Real.
- Evaluar la necesidad de re-purificación de los productos de ADN extraídos y cuantificar el éxito de dicho proceso.
- Comparar las metodologías de purificación y concentración de ADN, empleando columnas comerciales.

#### **1.4. Justificación**

El presente trabajo se ha planteado en base a la complejidad y dificultad, en los procesos de identificación a partir de muestras óseas humanas antiguas, que presentan los Laboratorios de Biología Molecular y de Genética ante la desaparición forzada de las víctimas. Nuestro país, específicamente en los Andes peruanos, ha sufrido mucho por estos sucesos, especialmente durante la época del terrorismo entre 1980 al 2000. Ante ello y para lograr la identificación genética de la mayoría de cuerpos esqueletizados es absolutamente necesario analizar los tres métodos de extracción de ADN planteados y escoger la mejor técnica con la que se logre conseguir una mayor concentración de esta molécula con una calidad aceptable y que a su vez sea reproducible para conseguir perfiles genéticos completos, con el éxito deseado, para futuros trabajos de investigación.

No realizar este tipo de investigación previa al proceso de identificación en casos que involucra restos óseos, impedirá evaluar el desarrollo de este proceso mediante la técnica de ADN y en casos que no se puedan obtener perfiles genéticos no se podrá saber si la causa es la metodología utilizada o la condición de la muestra. En cuanto a la calidad de la muestra, esta va de la mano con la alteración, conservación y preservación del tejido óseo; y relacionada de manera directa con la degradación de la matriz ósea y la cantidad de sustancias inhibitoras presentes. Con ello se podrá optar por un método de extracción específico y tratar correctamente este tipo de muestras biológicas, procedentes de un desastre natural u ocasionado por el hombre, así como los casos de lesa humanidad.

El presente trabajo busca cimentar y optimizar la etapa crucial de la extracción de ADN, lo cual permitirá; además de elevar su eficacia, captar la atención de los profesionales forenses y que vean gracias a ella metodologías alternativas, evidenciando las debilidades y las fortalezas de los protocolos de extracción empleados actualmente por los laboratorios forenses. Asimismo, minimizar los recursos empleados y establecer los procedimientos ante muestras

complejas de difícil manejo en los análisis moleculares.

### **1.5. Impactos esperados del Trabajo Académico**

La cantidad de ADN obtenida en este trabajo es la mínima requerida para obtener perfiles genéticos completos sin desbalance de heterocigotos, debido a que no se realizó la obtención de perfiles genéticos en este trabajo, pero si la predicción a través de la cantidad de ADN obtenida. La cantidad de ADN en cada tipo de muestra puede ser óptima para un solo modelo o específica para cada modelo en relación a cada mecanismo tafonómico. En este punto se deja abierta la posibilidad de continuar con el análisis y obtener la información del perfil genético de las muestras analizadas y correlacionarlo con las metodologías utilizadas.

Luego de obtener los resultados de cuantificación de ADN, a partir de restos óseos antiguos, se proyecta determinar la autenticidad de los perfiles genéticos que se obtienen con este tipo de muestras, ya que existe la gran probabilidad de obtener resultados que no tienen relación con el resto óseo en estudio, cuyo ADN se encuentra muy degradado, y por el contrario se logre obtener resultados de perfiles genéticos parciales o incompletos provenientes de pequeñas cantidades de ADN exógeno, el cual contamina la muestra.

Por otro lado, para obtener resultados confiables los investigadores necesitan analizar las muestras de cientos y en algunos casos de miles de individuos. El esfuerzo por recoger tantas muestras resulta ciertamente complicado, tanto a nivel temporal como a nivel económico, y muchas veces impide o limita el avance de los proyectos de investigación, es por ello que surgió la idea, complementaria a esta investigación, de crear pequeños biobancos, los cuales sirven como repositorios que permiten almacenar todo tipo de muestras biológicas e inclusive mantenerlas fuera del cuerpo humano por tiempo indefinido; para luego ser aprovechadas en diversos estudios.

## II. METODOLOGÍA

Siempre que se vaya a dar solución a un problema de manera científica, es necesario tener un conocimiento previo y a la vez detallado de los tipos de investigación posibles que se puedan desarrollar. Esto nos previene de errores al momento de elegir el método adecuado para un determinado procedimiento. En el presente trabajo se puede apreciar que la investigación corresponde al tipo retrospectiva, descriptiva y correlacional.

### *Retrospectivo*

Las muestras óseas, pertenecientes a fosas clandestinas durante la época de violencia social en nuestro país, fueron colectadas por personal especializado y enviadas al Laboratorio de Biología Molecular y Genética (LABIMOG) del Instituto de Medicina Legal - Ministerio Público para posteriormente entre los años 2011 al 2014, realizar la respectiva selección y análisis en aquellas muestras más representativas.

### *Descriptivo*

De acuerdo con la clasificación tradicional, la investigación descriptiva trabaja basándose en las realidades de un hecho, siendo su principal característica el presentar una interpretación correcta. Por ello, el presente trabajo es de tipo descriptivo al describir y medir las características físicas y técnicas de las variables de estudio (influencia tafonómica y la presencia de inhibidores); así como también describir las propiedades y particularidades de las metodologías de extracción molecular.

### *Correlacional*

Se trata de un estudio de tipo correlacional debido a las características de las muestras y al problema de la investigación, mediante el cual se estima la relación que pueda existir entre las variables que participan en este estudio. En este sentido, cuando una de ellas varía, la otra variable experimenta algún tipo de cambio, esto es tomando en consideración una constante que permite prever la forma de cómo se comporta una de las variables debido a los cambios

que experimenta la otra variable (en nuestro caso tanto la influencia tafonómica, la presencia de inhibidores y las metodologías de extracción de ADN, poseen entre ellas una relación directa). Esta relación se basa en la definición sobre los estudios de correlación establecidos por Hernández y Baptista (2003).

Tomando en cuenta el tipo y diseño de investigación, las variables en este estudio son las siguientes:

### ***Variable Independiente***

El efecto tafonómico y las sustancias inhibidoras de la PCR. Variables de tipo cualitativa y cuantitativa, respectivamente, representadas por el estado de conservación de cada muestra analizada, cuyos resultados se obtienen mediante la técnica de PCR en tiempo real.

### ***Variable Dependiente***

Las metodologías de extracción molecular. Es una variable de tipo cuantitativo, representada por las cantidades de ADN obtenidas en la curva de la técnica de PCR en tiempo real.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genética del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses del Ministerio Público, sede en Lima – Perú, durante el periodo del 2010 al 2014.

Se destaca el hecho de que no se está considerando los datos personales de las muestras óseas esqueletizadas debido a que pertenecen a personas no identificadas; asimismo se resalta que la colecta y el procesamiento de estas muestras corresponde a una actividad rutinaria dentro del Laboratorio con el propósito de lograr su identificación (lo cual no representa el propósito del presente trabajo); por lo tanto, la presente investigación es un trabajo que se despliega de las mencionadas actividades cotidianas no siendo el fundamento de las mismas.

## **2.1 Población y muestra de estudio**

Las muestras de estudio han sido colectadas de tres contextos tafonómicos diferentes,

expuestos a tres mecanismos deteriorantes como son el impacto ácido, alcalino y microbiano. Inicialmente fueron consideradas 119 muestras, recolectadas de estos tres contextos ambientales, se trata de 57 muestras óseas pertenecientes a cuerpos que han sido expuestos a un medio alcalino, 37 cuerpos saponificados que fueron recuperados de contextos contaminados con fauna micótica y 25 cuerpos completamente esqueletizados que evidencian diagénesis del tejido óseo los cuales provienen de un contexto ácido. De estas 119 muestras, sólo 55 muestras de fémur cumplían con los criterios de inclusión, por lo que se analizaron 15 muestras expuestas a un impacto tafonómico alcalino, 15 provenientes de un medio micótico y 25 muestras pertenecientes a un impacto tafonómico ácido (08 restos de un medio ácido severo, 09 restos expuestos a un medio ácido moderado y 08 restos óseos provenientes de un medio ácido leve), siendo estas 55 muestras las más representativas para el respectivo análisis.

Para la realización del presente trabajo se contó con diversos equipos e instrumentos de laboratorio ubicados en el Área de Pre Tratamiento II (área especial para la limpieza y pulverización de restos óseos), Área de Extracción Biológica II (área especializada en extracción de ADN a partir de restos óseos), Área de Pre-Amplificación y Área de Cuantificación del LABIMOG, los cuales son descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1***Principales instrumentos y equipos empleados en la presente investigación*

<b>N°</b>	<b>Descripción del equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
1	Autoclave	BELTEC	S/M**
2	Balanza analítica	ADAM	AFP-2 100 L
3	Equipo baño maría	GFL	1083
4	Cabina de trabajo	C.B.S.	P-048-202
5	Campana de flujo laminar	HOLTEN	BIOSAFE 1,2
6	Campana de seguridad	S/M*	S/M
7	Centrifuga	EPPENDORF	5415 D
8	Centrifuga	EPPENDORF	5810 R
9	Centrifuga	QUALITRON INC	DW-41BR-230
10	Congeladora	BOSCH	FB26
11	Congeladora	SANYO	MDF-U51865
12	Congeladora eléctrica vertical -20°C	THERMO FORMA	3670
13	Esterilizador	MEMMERT	UM 500
14	Freezer Mill	SPEX SamplePrep	6770
15	Lavador ultrasónico	STERIS	250DTH
16	Micropipeta 0.5 - 10 µL	MICROPIPET	GILSON
17	Micropipeta 2 - 20 µL	MICROPIPET	GILSON
18	Micropipeta 10 - 100 µL	MICROPIPET	GILSON
19	Micropipeta 100 - 1000 µL	MICROPIPET	GILSON
20	Micropipeta 100 - 1000 µL	MICROPIPET	GILSON

N°	Descripción del equipo	Marca	Modelo
21	Micropipeta rango 500 - 5000 $\mu$ L	EPPENDORF	5000
22	Termociclador	EPPENDORF	22331
23	Balanza analítica	OHAUS	HARVAR TRIP
24	Termociclador	APPLIED BYOSYSTEM	ABI 7500
25	Rotador de tubos	SCIENTIFIC INUSTRIES	51-1101
26	Vortex con graduación de velocidad	BARNSTEAD	M376610 – 33
27	Centrifuga personal	LABNET	C 1301 MULTIPETTE
28	Micropipeta de rango variable	EPPENDORF	PLUS
29	Centrifuga 1.5 mL con adaptadores	EPPENDORF	5415 D
30	Centrífuga	HETTICH	UNIVERSAL320
31	Termociclador	APPLIED BIOSYSTEMS	9902
32	Sierra quirúrgica	STAINLESS	S/M**
33	Taladro Dremel	S/M*	S/M**
34	Termociclador en Tiempo Real.	APPLIED BIOSYSTEMS	S/M**
35	Robot semi automático QIAcube	QIAGEN	S/M**
36	Robot semi automático QIAgility	QIAGEN	S/M**

*Nota.* S/M\* (sin marca). S/M\*\* (sin modelo).

## 2.2 Procedimientos

### 2.2.1 Selección de las muestras

Este es el inicio de la investigación y consiste en recolectar el material biológico (hueso y/o diente antiguo), en diferentes estados de conservación, de los casos que involucran la

violación a los Derechos Humanos en el Perú, principalmente de aquellas comunidades ubicadas en el departamento de Ayacucho. La colecta y selección de dichas muestras estuvo a cargo de profesionales especializados en ciencias forenses quienes forman parte del equipo de trabajo en el LABIMOG. La selección de muestras se realizó en dos etapas, la primera realizada en el mencionado Laboratorio durante el año 2011 (del grupo de muestras pertenecientes al periodo 1980 – 2000, que fueron colectadas y enviadas al LABIMOG) y la segunda etapa consistió en seleccionar el material a partir de los muestreos ocurridos entre el 2012 y 2014 en el Laboratorio de Investigaciones Forenses de Ayacucho (LIFA) del Instituto de Medicina Legal – Ministerio Público. Una vez seleccionada la muestra ésta fue colocada en un sobre manila de primer uso (si la muestra ósea es de regular tamaño) o en un tubo de polipropileno estéril tipo Falcon (si la muestra es pequeña), en ambos casos se rotuló adecuadamente para ser enviada al LABIMOG para su análisis (ver Figura 1 y Figura 2).

La selección de las muestras para el análisis de ADN, se realizó conforme a la siguiente descripción:

**Huesos.** Se seleccionaron los huesos largos, preferiblemente fémur, húmero y/o tibia, ya sea la pieza entera o el tercio medio de 7 a 10 cm de longitud. Se prefirió escoger aquellos huesos con superficie externa lisa, brillante y que aparente el mejor estado de conservación posible.

**Dientes.** Debido a que se tuvo acceso a este tipo de muestra, se seleccionó al menos cuatro piezas dentales, de preferencia las piezas molares enteras, sin fisuras, que no estén externamente dañadas ni hayan sido sometidas a endodoncias y lo más limpias superficialmente.

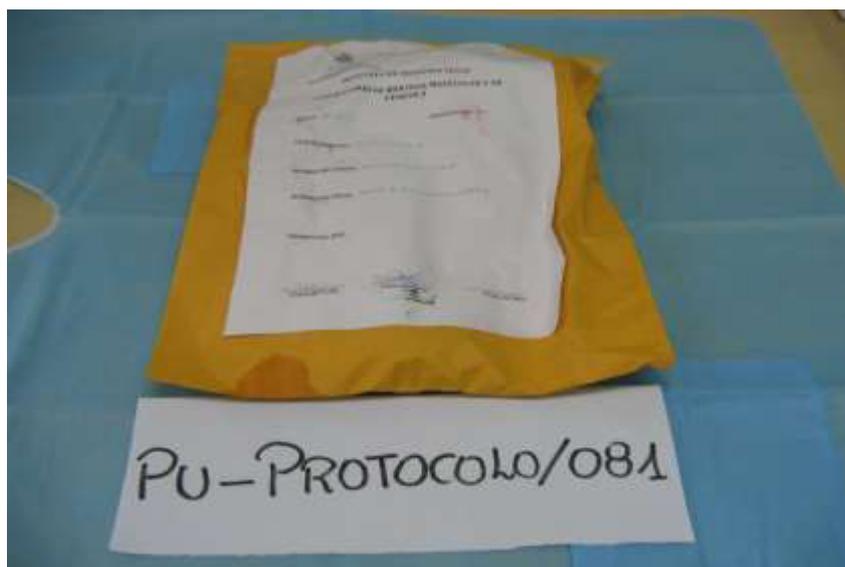
En ambos casos, la manipulación se realizó en todo momento con guantes estériles y la protección adecuada para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada.

Finalmente se contó con un total de 119 muestras; sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, de este total se analizaron 55 muestras óseas que reunían los requisitos para la

presente investigación, las mismas que fueron conservadas en el área de custodia del LABIMOG, hasta su requerimiento en el área de pre – tratamiento de restos óseos para su procesamiento.

### **Figura 1**

*Muestra ósea antigua que llega al LABIMOG*



### **Figura 2**

*La muestra aperturada puede ser un hueso completo o un fragmento de hueso*



#### **2.2.2 Pretratamiento del hueso**

Lo realizado previo a esta etapa ha sido en circunstancias comunes, es decir que no es necesario que al momento de obtener la muestra sea en condiciones de completa esterilidad.

Pero sí es imprescindible el uso de guantes para evitar la contaminación de la muestra con agentes exógenos por contacto.

Estando en esta primera etapa del procesamiento, cuando se desea extraer material genético del resto óseo, deben tomarse las debidas precauciones para manipular estos restos antiguos, tales como trabajar dentro de una cabina de bioseguridad, usar bata estéril, malla para cubrir el cabello, toga, mascarilla y guantes estériles de preferencia sin talco. El material a emplear debe ser completamente estéril, desde las sierras descartables para realizar los cortes, las brocas que utiliza el equipo multiusos Dremel que también se descartan luego de cada uso, de igual forma las hojas de bisturí se deben descartar por cada muestra utilizada. Los contenedores para realizar el lavado (sean bolsas tipo ziploc o recipientes de plástico) deben ser de primer uso y estériles.

En primer lugar, se empieza con el corte de un fragmento de 7cm, aproximadamente, de hueso (Figura 3), se elimina cualquier tejido blando que se encuentre en la superficie y en su interior con la ayuda de un bisturí (ver Figura 4). Si se trata de un hueso largo como el fémur, el fragmento óseo se obtiene de su tercio medio y se corta longitudinalmente. Con la ayuda de la herramienta rotativa (Dremel) se hace un barrido superficial a todo el corte del fragmento, tanto por dentro como por fuera (Figura 5). Luego se coloca este fragmento en un contenedor de plástico estéril o en una bolsa de polietileno con cierre hermético (tipo ziploc), al cual se le agregó 50 - 100 mL de DTT a 1M, hasta cubrir completamente el fragmento óseo (Figura 6), se dejó actuar por 5 minutos en el sonicador para poder eliminar todo elemento asociado al resto óseo, como los hongos, entre otros. Luego se cambió el contenedor o bolsa ziploc para enjuagar con agua destilada por 30 segundos a 1 minuto. Continuando con el proceso, se lava con lejía al 10%, dos veces por 30 segundos cada vez. Se descarta el contenido y se coloca la muestra ósea en una nueva bolsa ziploc para proceder a lavar con agua destilada y frotar la bolsa ziploc para seguir eliminando impurezas, luego se coloca el hueso en una nueva bolsa

ziploc con agua destilada o agua ultra pura durante 5 minutos. Lavar una vez con etanol absoluto y dejar secar a temperatura ambiente (Figura 7). Finalmente, el resto óseo se coloca bajo luz ultravioleta (254 nm) durante 15 minutos por cada lado.

El fragmento óseo fue envuelto con papel previamente estéril y sometido a 60C° por dos horas en el horno (ver Figura 8).

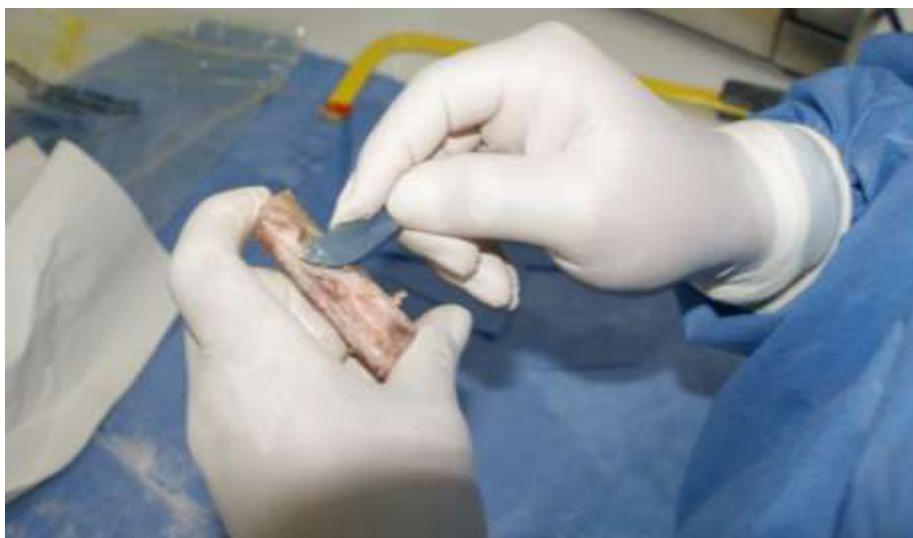
### **Figura 3**

*Se corta un fragmento de 6 a 7 cm de longitud del hueso seleccionado*



### **Figura 4**

*Con ayuda del bisturí se procede a retirar el tejido blando de la superficie*



**Figura 5**

*Se retira la suciedad y tejido blando del interior del fragmento óseo*

**Figura 6**

*Lavado de los fragmentos óseos*



**Figura 7**

*Se enjuaga con agua ultra pura y etanol absoluto. Secado a temperatura ambiente*

**Figura 8**

*Se envuelve el fragmento óseo en papel estéril y se lleva al horno a 60 °C*



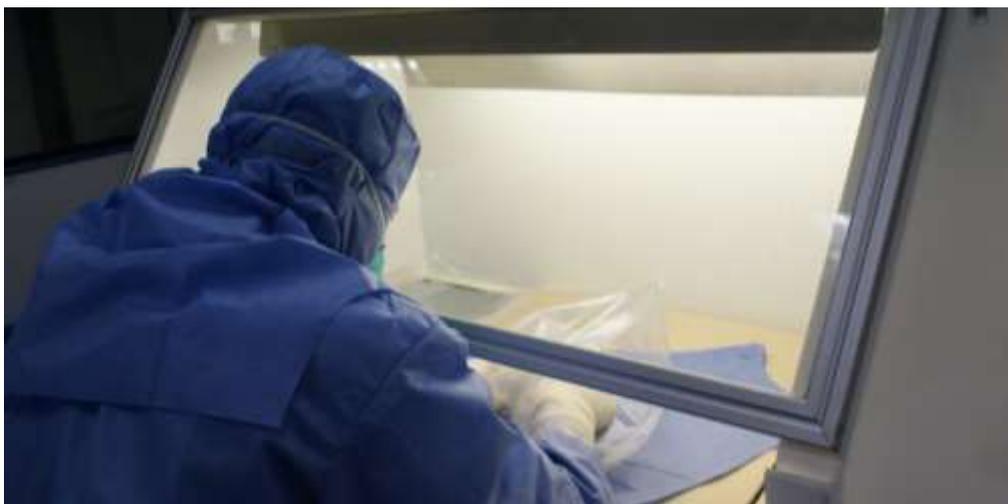
### **2.2.3 Pulverización de muestras óseas antiguas**

Para la etapa de pulverización se empleó la herramienta de motor rotativa multiusos

(taladro *Dremel*) con el fin de obtener el pulverizado dentro de una cabina de bioseguridad (Figura 9 y 10), o en su defecto se utilizó el equipo de pulverización/ impactador con nitrógeno líquido llamado Freezer Mill, donde cada una de sus piezas fueron lavadas y esterilizadas previamente y expuestas a luz ultravioleta. Para emplear el Freezer Mill, las muestras se cortaron en fragmentos de 2.5 a 3.0 cm de largo y 1.0 cm de ancho, aproximadamente, con ayuda de una sierra descartable o un martillo y así obtener fragmentos más pequeños para que puedan ser introducidos en los respectivos viales y puedan colocarse en el equipo para su pulverización. En esta etapa se determinó la cantidad de muestra necesaria para los métodos de extracción utilizados. Para esta etapa, se trabajó con cantidades de 1.5 g y 1.0 g de los polvillos obtenidos, los mismos que fueron pesados en la balanza analítica y debidamente rotulados para pasar a la siguiente etapa (Figura 11 y 12). El polvo de hueso puede almacenarse en el congelador a  $-4^{\circ}\text{C}$  si el procedimiento no se realizará en los próximos días o en lugar fresco y seco a temperatura ambiente si pasa a la siguiente etapa durante los próximos días y continuar con el análisis.

### **Figura 9**

*Con vestimenta apropiada y dentro de una cabina de bioseguridad*



**Figura 10**

*Se retira la capa superficial con ayuda del taladro Dremel y se pulveriza el hueso*



**Figura 11**

*El polvillo obtenido se almacena y rotula en un tubo Falcon de 50 mL*



**Figura 12**

*Se pesa la cantidad necesaria del polvillo obtenido para la extracción del ADN*

**2.2.4 Digestión con solución de lisis**

El polvo de hueso obtenido luego de la pulverización, dependiendo de la muestra que se está procesando, se lava con EDTA 0.5M pH 8, debido a que el EDTA es un quelante iónico que actúa secuestrando las sales iónicas contenidas en la muestra como el calcio presente en los huesos (Figura 13).

Cabe mencionar que de ser este el caso, algunas de las muestras (dependiendo de su estado de conservación y preservación) pueden necesitar varios lavados por lo que es necesario llegar a un acuerdo entre el número de lavados y la suciedad de la muestra, esto hay que tener en cuenta ya que en cada lavado se llega a perder cierta cantidad de DNA, el cual se encuentra contenido en la hidroxiapatita, que llega a pasar al sobrenadante. Una vez lavado el sedimento, se debe mantener en refrigeración a 4°C hasta llevar a cabo la fase de digestión.

Una vez presentes en esta fase, la solución de lisis rompe las membranas de las células óseas, específicamente de los osteoclastos, para luego liberar el material genético que está en el núcleo y las mitocondrias.

Esta solución está compuesta de EDTA, Tris-HCl, SDS y proteinasa K. El primer compuesto es el quelante iónico, EDTA, el cual tiene como función eliminar aquellas sales que han quedado después de los lavados y las sales liberadas de las células luego de la ruptura de las membranas, el Tris-HCl hace las veces de un estabilizador del pH, el SDS es un detergente aniónico, el cual trabaja disolviendo las grasas y lípidos orgánicos que han podido quedar. Finalmente, la proteinasa K es una enzima cuya función es hidrolizar las proteínas.

Tanto el EDTA, Tris-HCl y la proteinasa K son soluciones estériles prefabricadas. EL SDS se prepara diluyendo la cantidad en polvo adecuada en un volumen de agua estéril. Cuando se encuentre disuelta se filtra y es almacenada en botellas de vidrio estériles.

### ***2.2.5 Extracción de ADN a partir de tejido óseo antiguo***

La metodología se eligió de acuerdo al el tipo y estado de la muestra que se destinó para el análisis, con reactivos y equipos estandarizados a nivel internacional pertenecientes al LABIMOG. Por otro lado, se tuvo en cuenta la posible presencia de ciertos inhibidores muy comunes en estos casos, como el ácido húmico o compuestos fenólicos en el suelo y tierra, fosfato de calcio en los huesos y esmalte de dientes, así como ciertos detergentes en los reactivos de extracción de ADN.

El procesamiento de huesos para la extracción de ADN, sobre todo en casos donde se encuentran muestras altamente contaminadas con hongos, genera la dificultad para la obtención de ADN y la construcción de los perfiles genéticos. Este problema se focaliza en la capacidad de obtener ADN en relación con la cantidad y calidad en restos óseos expuestos a una diversidad de factores deteriorantes. Es así que, entre los aspectos más importantes para la obtención de ADN de calidad, se encuentra la inhibición de la PCR por productos remanentes

luego de un proceso de extracción, estas sustancias pueden tener un origen endógeno y/o exógeno.

Se probaron tres metodologías para extraer ADN de tejido óseo, uno de ellos basado en una metodología de extracción completamente orgánica, el segundo se trata de un método de extracción combinado (digestión y desmineralización), y la tercera es una técnica de extracción no orgánica que se basa en el aislamiento de ADN total de las muestras de hueso, empleando el kit de la casa comercial QIAgen.

### **Figura 13**

*Descalcificación y/o desmineralización, según el método de extracción*



**2.2.5.1 Extracción con solventes orgánicos (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. Método validado para restos óseos).** La extracción de ADN a partir de este tipo de muestras biológicas recolectadas, fueron procesadas inicialmente mediante el método de extracción orgánica, fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en la proporción 25:24:1, respectivamente, la cual ha sido desarrollada y descrita por Miller et al. (1998) y modificada por Ausubel et al. (2004). Cabe mencionar que, si bien es cierto se trata de un método muy útil y efectivo para tratar este tipo de muestras degradadas, presenta inconvenientes en cuanto a la toxicidad de los solventes orgánicos que se emplean y los grandes volúmenes con los que se trabaja.

El protocolo establece como paso previo la digestión proteica del pulverizado óseo (1.0 g - 1.5 g) con 400  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/ml), el cual lisa las células y remueve las proteínas que brindan protección al ADN como las histonas que empaquetan el ADN para que obtenga la forma de cromosoma (Del Valle, 2002), y un detergente como el SDS al 10% que rompe las membranas celulares, el mismo que forma parte de los 6ml del buffer de digestión (Tris-HCl 10 mM, SDS 0.1%, EDTA 50 mM, DTT 39 mM), todo es mezclado en un tubo de polipropileno tipo Falcon de 50 mL. Se incuba toda la noche en baño con agua a 56°C. Al siguiente día se centrifuga a 4000 rpm por 5 minutos, luego el sobrenadante es transferido a otro tubo de 50 mL. Este sobrenadante es mezclado con una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1 respectivamente, paso que es repetido hasta eliminar la coloración lechosa del extracto, el cual muchas veces no llega a eliminarse por completo, así el pulverizado óseo, obtenido en la fase anterior, pasará por un proceso de descalcificación. Se centrifuga a 14000 rpm por 3 minutos con cada adición de los solventes orgánicos. Se trasvasa la fase acuosa, que contiene el ADN, a un tubo de polipropileno Eppendorf de 1.5 mL.

Seguidamente, el ADN es concentrado y purificado con las columnas Centricon® YM-100. Previamente, las columnas fueron hidratadas con 400  $\mu$ L de agua nano pura. Así, el

sobrenadante del extracto se agrega a la columna del Centricon® y se centrifuga a 3500 rpm por 10 minutos. Dependiendo de la naturaleza y/ o el estado de conservación de la muestra se agrega 400 µL de agua nano pura a la columna y se vuelve a centrifugar de la misma forma. Como paso final se invierte la columna y se centrifuga a 3500 rpm por 5 minutos y de esta manera se recupera el ADN que ha sido extraído. Las muestras homogenizadas y resuspendidas selectivamente estarán listas para PCR y serán almacenadas a -20 °C.

**2.2.5.2 Desmineralización total – columnas de sílica QIAamp DNA Investigator de QIAGEN® (International commission of missing persons).** Este protocolo varía al descrito anteriormente, ya que está representado por una modificación en el proceso de la descalcificación (Loreille et al., 2007). Esta metodología de extracción ha sido tomada del protocolo de la Comisión Internacional de Personas Desaparecidas (ICMP, *International Commission of Missing Persons* por sus siglas en inglés), el cual ha sido modificado y mejorado con el tiempo debido al desarrollo de proyectos de identificación de personas desaparecidas realizados por los investigadores a nivel mundial. Este método consiste en una digestión inicial y total de la matriz ósea, por lo que busca su desmineralización total, ya que en esta fase casi no debe quedar resto de dicha matriz. En un tubo tipo Falcon de 50 mL colocamos 1gr de pulverizado de hueso, se añade 15 mL de EDTA al 0.5 M (potente secuestrador de calcio que produce la desintegración de la matriz ósea) y 1.5 mL de SDS al 10%, ambas cantidades se adicionarán por cada gramo de hueso pulverizado. Homogenizar e incubar en un baño de agua a 56°C hasta el día siguiente.

Se procede a centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante. La desmineralización total consiste principalmente en la adición de reactivos como proteinasa K (20 mg/ml) 500 µL y los que conforman un buffer de lisis (6 mL), tales como el EDTA al 0.5 M, Tris – HCl 10 mM, SDS al 0.1%, DTT 39 mM, mezclar con el sedimento obtenido e incubar en baño de agua a 56°C por 24 horas, al día siguiente centrifugar la muestra a 4000 rpm x 10

minutos, decantar el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon de 50 mL y desechar el sedimento. De acuerdo al estado y consistencia del extracto, este es filtrado en dispositivos de ultrafiltración como las columnas Amicon® de concentración 15, de 100 milipores o de 30 milipores, esto en función de la degradación del resto óseo que se está analizando, antes de su uso se puede hidratar la membrana de las columnas con 400 µL de agua ultra pura.

Para realizar la purificación del extracto obtenido, el volumen recuperado se procesó de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial del kit QIAquick®, con algunas modificaciones dadas por la ICMP. Pese a que este kit fue diseñado para la purificación de productos de PCR, ha ofrecido un correcto rendimiento en la purificación de ADN total, tal como lo indican los autores, los mismos que hacen mención a la re-purificación, en aquellas situaciones que se manifieste la co-purificación de inhibidores luego del proceso de extracción de ADN. Este proceso puede ser aplicado tanto en este protocolo de extracción como en extractos obtenidos a partir de otros protocolos. El proceso de re-purificación consiste en procesar de nuevo el extracto con el kit QIAquick®, siguiendo prácticamente las especificaciones de la casa comercial. Una vez recuperado el ADN, las muestras serán almacenadas bajo refrigeración a -20°C listas para la PCR.

**2.2.5.3. Kit QIAamp DNA Investigator de QIAgen®.** Esta metodología está basada en columnas de sílica, consiste en el uso del kit comercial QIAamp DNA Investigator para un volumen de muestra de 100 µL, siguiendo las recomendaciones del fabricante para la extracción de muestras óseas degradadas.

Se transfiere el sobrenadante obtenido en el paso anterior a la columna QIAamp MinElute en un tubo de 2 mL para su purificación siguiendo las instrucciones que indica el protocolo. El ADN purificado trabaja correctamente en análisis posteriores, como el análisis cuantitativo de PCR y en la obtención de perfiles genéticos con STR.

El kit QIAamp purifica el ADN genómico a partir de una gran variedad de muestras de

interés forense como es el caso de tejido óseo.

El protocolo de lavado (Manual Kit QIAamp DNA Investigator) será aplicado en este procedimiento. Una modificación de este protocolo es adherir 500  $\mu$ L de etanol antes del secado total de la membrana. Finalmente, el ADN es incubado con Buffer de elución AL (Kit QIAamp DNA Investigator), el mismo que es agregado al centro de la membrana, por 5min y centrifugado a máxima velocidad (14000 rpm) por 1 minuto, para obtener un volumen final de elución de 40  $\mu$ L aproximadamente. Cabe mencionar que el procedimiento de lavado varía dependiendo del estado de degradación de la muestra.

### **2.3. Método de análisis**

#### ***2.3.1. Cuantificación por PCR en tiempo real***

Los extractos de ADN obtenidos se cuantificaron empleando los modelos Quantifiler human y Quantifiler del cromosoma Y del kit Quantifiler® Duo DNA Quantification (ver descripción en Tabla 2). Por otro lado, el proceso de cuantificación en tiempo real se desarrolló de acuerdo a una secuencia de termociclado, el cual ha sido desarrollado y validado por Applied Biosystems y llevado a cabo en el analizador genético ABI PRISM SDS 7500 Real Time PCR Systems de Applied Biosystems del LABIMOG.

Estos dos modelos de cuantificación se sustentan en la amplificación de una región específica del gen de la ribonucleasa humana y del gen SRY, respectivamente. Dichos modelos emplean la tecnología Taqman, donde la existencia del fragmento indica el aumento de fluorescencia. Para el desarrollo del PCR Master Mix se desarrolló un protocolo para el uso del mencionado kit en el robot automatizado QIAgility de QIAgen.

**Tabla 2**

*Regiones de interés en la cuantificación por PCR en tiempo real mediante el Kit Quantifiler*

*Duo DNA*

<b>Target</b>	<b>Gen</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Longitud del producto que se amplifica</b>	<b>Gen ID</b>	<b>Ploidía</b>
	Gen de la				
Human	Ribonucleasa				
Target	P RNA componente	14q11.2	140 bases	85495	Diploide
	H1 (RPPH1)				
Human	Sexo -				
Male	determinando				
Target	la Región Y (SRY)	Yp11.3	130 bases	6736	Haploide

Adaptada de “Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit User's Manual”. PN 4391294 Rev.

A

### **2.3.2. Purificación del ADN**

Previo a la fase de purificación de ADN en muestras óseas se utilizaron dispositivos de ultrafiltración como el Centricon® y Amicon® con el propósito de desarrollar una concentración del ADN exitosa e impedir la pérdida de ADN durante su procedimiento (Goodwin y Ovchinnikov, 2001).

Ya en la etapa de purificación, para conseguir un mejor rendimiento en la amplificación de los extractos de ADN luego de realizar el proceso de concentración con los dispositivos

mencionados, se empleó el Kit MiniElute PCR purification de QIAgen® con sus respectivas columnas de sílice (Figura 14 y 15). Asimismo, para elevar los rendimientos obtenidos con el empleo del Kit comercial de QIAgen® se pueden desarrollar variaciones en el mismo, siguiendo lo recomendado por Andelinovic et al. (2001).

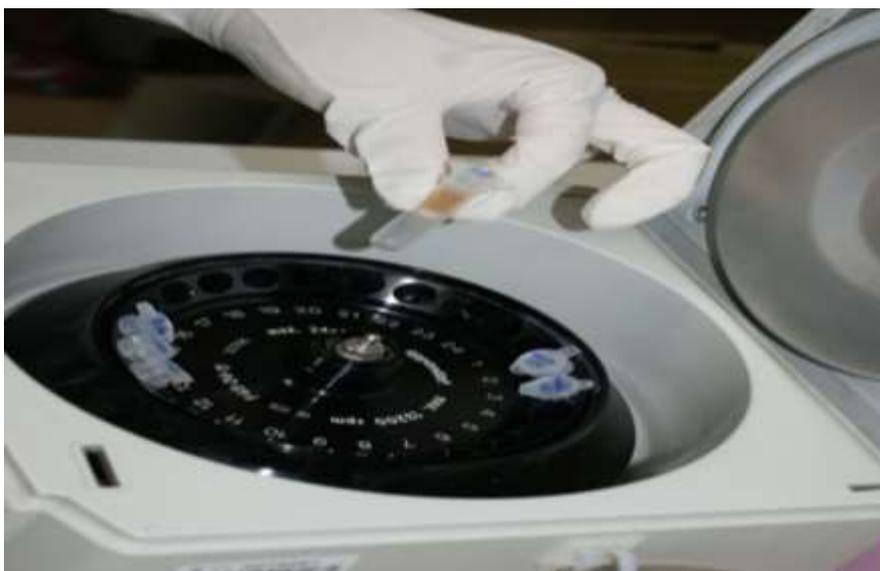
#### **Figura 14**

*Se agregan los buffers al ADN colectado para su purificación*



#### **Figura 15**

*Centrifugación de los extractos de ADN en columnas de sílica*



### **2.3.3. Posibles Inhibidores de la PCR**

Como se ya ha mencionado, la principal dificultad para la realización del análisis a partir de muestras óseas es la presencia de inhibidores de la PCR; siendo los más comunes los ácidos húmicos y fúlvicos (presentes en la tierra, lugar de entierro), restos de porfirinas; ya que sólo se necesita 100 ng/ $\mu$ l de estos compuestos para inducir una inhibición parcial o total de la amplificación; esto es debido a que tienden a formar productos inespecíficos con las moléculas de ácidos nucleicos, quedando retenidas junto con el ADN en la membrana de las columnas de purificación (Arroyo et al., 2003).

Cabe mencionar que, en cada lugar de entierro las condiciones de preservación, así como la eficiencia de recuperación de la información genética pueden variar en individuos diferentes e incluso entre muestras de un mismo individuo. Es así que, de acuerdo a lo mencionado en la literatura, es suficiente un análisis macroscópico sobre la apariencia física y el estado de preservación que evidencia la muestra ósea, antes de la etapa de extracción de ADN; para anticipar si la muestra a trabajar tendría un difícil manejo durante la realización del análisis (Goodwin y Ovchinnikov, 2001). Pese a ello, para descartar aquellas muestras que a simple vista suponían pocas garantías de éxito en su amplificación, se evidenció el éxito de eliminación de inhibidores con los análisis del IPC en el termociclador en tiempo real.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Cantidad de hueso pulverizado para la extracción de ADN

Se determinó la cantidad mínima de muestra de tejido óseo necesaria para poder trabajar en los tres tipos de impactos tafonómicos. Siendo la cantidad idónea 1.0 g para muestras que estuvieron enterradas en medio alcalino y 1.5 g de pulverizado óseo para aquellas expuestas a los otros tipos de impactos tafonómicos (medio ácido y micótico), tal como se aprecia en la Tabla 3.

Por lo tanto, la cantidad de ADN recuperado en las muestras analizadas que presentaron condiciones de conservación y preservación buenas no tuvo pérdida importante de material genético, cuya obtención se logró con 1.0 g de muestra ósea pulverizada para los tres métodos de extracción propuestos.

La cantidad de muestra fue decisiva en los resultados de obtención de ADN. Aquellas muestras que presentaron características particulares, es decir que su estado de conservación y preservación no fueron adecuados, no arrojaron resultados reproducibles con 1.0 g de polvillo óseo, por lo que se volvieron a procesar con 1.5 g mostrando resultados de ADN en la mayoría de ellas, conteniendo al menos 0.02 ng/mL de ADN.

**Tabla 3**

*Cantidad inicial de pulverizado óseo para la obtención de ADN*

Contexto de las muestras y Pulverización	Peso en gramos	
	En buen estado	En mal estado
Alcalino - Pulv. con Nitrógeno Líquido	1.0 g	---
Alcalino - Pulv. con Dremel	1.0 g	---
Ácido - Pulv. con Nitrógeno Líquido	1.0 g	1.5 g

<b>Contexto de las muestras y</b>	<b>Peso en gramos</b>	
	En buen estado	En mal estado
<b>Pulverización</b>		
Ácido - Pulv. con Dremel	1.0 g	1.5 g
Micótico - con Nitrógeno Líquido	1.0 g	1.5 g
Micótico - Pulv. con Dremel	1.0 g	1.5 g

Se evaluó la relación que existe entre las características macroscópicas de la muestra como la integridad y el color del resto óseo con la eficacia de los resultados y los inhibidores presentes.

En tal sentido, tanto las muestras pulverizadas como los extractos de ADN evidencian una estrecha relación en cuanto a su apariencia física, lo cual se refleja en el éxito o no de la obtención de ADN durante el análisis. Esto se hizo evidente también durante la fase de extracción de ADN, ya que aquellas muestras que presentan un mayor estado de degradación mostraron una coloración naranja y marrón, en el extracto de ADN, lo cual se debe al grado de degradación del material genético, así como a la presumible cantidad de inhibidores en las muestras de tejido óseo.

### **3.2 Comparación de las tres metodologías de extracción de ADN a partir de restos óseos antiguos.**

Los valores promedio obtenidos de las extracciones de los restos óseos incluidos en el presente trabajo para el parámetro de cuantificación se muestran en la Tabla 4. Asimismo, en la Tabla 5 se aprecia los resultados de ambos parámetros, es decir cuantificación de ADN y presencia de inhibidores por PCR en Tiempo Real, referentes a la comparación de los métodos de extracción de ADN y de las condiciones tafonómicas de entierro, a partir de las muestras más representativas de tejido óseo antiguo analizadas en la presente investigación.

**Tabla 4**

*Promedio de la concentración de ADN en muestras óseas antiguas procesadas por diferentes métodos*

<b>Impacto</b>	<b>Cantidad de ADN (ng/μl)</b>		
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Alcalino	0,135	0,105	0,031
Ácido	0,098	0,068	0,036
Húmedo/ micótico	0,246	0,145	0,031

*Nota.* A, B y C son metodologías de extracción. A= Solventes orgánicos, B= Desmineralización y C= Kit comercial.

**Tabla 5**

*Resultados de la cuantificación de ADN por PCR en tiempo real a partir de restos óseos antiguos*

Código	Impacto Tafonómico	<b>Metodologías de Extracción de ADN</b>					
		<b>Orgánica</b>		<b>Desmineralización</b>		<b>Kit Comercial</b>	
		ng/μl	Ct del IPC	ng/μl	Ct del IPC	ng/μl	Ct del IPC
CAB-23	Alcalino	0,1	28,17	0,08	29,30	0,04	29,13
CAB-28	Alcalino	0,08	32,99*	0,04	29,25	NA	29,50
CAB-42	Alcalino	0,26	34,02	0,2	28,17	0,037	29,53
CAB-43	Alcalino	0,15	28,17	0,14	29,0	0,049	29,13
CAB-53	Alcalino	0,15	27,89	0,13	28,15	0,04	28,15
CAB-56	Alcalino	0,07	Indet *	0,037	29,53	0,019	29,30

Metodologías de Extracción de ADN							
Código	Impacto Tafonómico	Orgánica (Centricon® YM-100)		Desmineralización (Amicon®/ QIAamp)		Kit Comercial (QIAamp DNA Investigator)	
		ng/μl	Ct del IPC	ng/μl	Ct del IPC	ng/μl	Ct del IPC
PIC-01	Ácido (severo)	0,036	28,91	0,04	28,15	0,008	32,40
PIC-03	Ácido (severo)	0,04	32,99	0,04	29,02	NA	29,50
PIC-07	Ácido (moderado)	0,039	29,25	0,037	29,53	0,019	30,14
PIC-08	Ácido (severo)	0,04	Indet *	0,019	28,91	0,07	29,13
PIC-09	Ácido (moderado)	0,1	28, 91	0,13	28,79	0,04	29,02
PIC-10	Ácido (moderado)	0,11	28, 91	0,08	28,91	0,094	28,91
PIC-12	Ácido (leve)	0,2	28,17	0,11	28,17	0,036	28,91
PIC-14	Ácido (leve)	0,14	Indet *	0,12	29,07	0,028	28,10
PIC-25	Ácido (leve)	0,18	27,90	0,037	28,15	0,03	29,53
PUC-54	Húmedo-micótico	0,24	28,79	0,18	Indet *	0,04	29,13
PUC-63	Húmedo-micótico	0,19	34,02*	0,04	29,02	NA	29,50
PUC-70	Húmedo-micótico	0, 2	28,17	0,26	34,02*	0,037	29,53
PUC-71	Húmedo-micótico	0, 26	28,17	0,14	29,0	0,08	29,13
PUC-74	Húmedo-micótico	0,23	28,17	0,13	Indet *	0,008	29,30
PUC-75	Húmedo-micótico	0, 36	28,15	0,12	32,99*	0,019	29,96
Control+	---	0,3	28,81	0,3	28,81	0,3	28,81
Control -	---	NA	28,61	NA	28,61	NA	28,61

*Nota.* Se aprecia los resultados obtenidos mediante la PCR en tiempo real y del umbral de detección (Ct) obtenidos a partir de la extracción de ADN proveniente de restos óseos antiguos;

mediante la aplicación de tres metodologías diferentes y de acuerdo a las condiciones tafonómicas de entierro. CAB= Caso Cabitos, PIC= Caso Pichari, PUC= Caso Pucayacu.

Ct= Umbral de detección de la cantidad de ADN presente en la muestra. IPC= Control Interno de la PCR en Tiempo Real. Indet= Cuando el IPC es mayor a 31, alta cantidad alta de inhibidores en la muestra, requiere nueva purificación. NA= Cuando la cuantificación es indeterminada y el IPC menor a 31, no hay ADN en la muestra. \*= Se tuvo que diluir los extractos para amplificar las muestras. Control + = Control Positivo. Control - = Control Negativo.

### **3.3 Cantidad de ADN por PCR en tiempo real**

Las metodologías analizadas en la presente investigación se llevaron a cabo considerando el abastecimiento de reactivos, equipos e instrumentos con los que contaba el LABIMOG, siendo los factores determinantes, al decidir una u otra metodología a emplear, los óptimos rendimientos obtenidos por ellas y el tipo de investigaciones en las que se implementaron.

Para poder determinar la cantidad de ADN amplificable presente en una determinada muestra se utilizó el kit comercial de cuantificación Quantifiler Duo DNA de Applied Biosystems, designado para cuantificar de manera simultánea la cantidad total de ADN humano y ADN masculino humano en una muestra. Los resultados obtenidos usando este kit determinan si la muestra en estudio contiene ADN humano o ADN masculino en cantidad suficiente para usar marcadores STRs (*Short Tandem Repeats*, por sus siglas en inglés) para la futura obtención de perfiles genéticos y si los inhibidores de la PCR están presentes en dicha muestra.

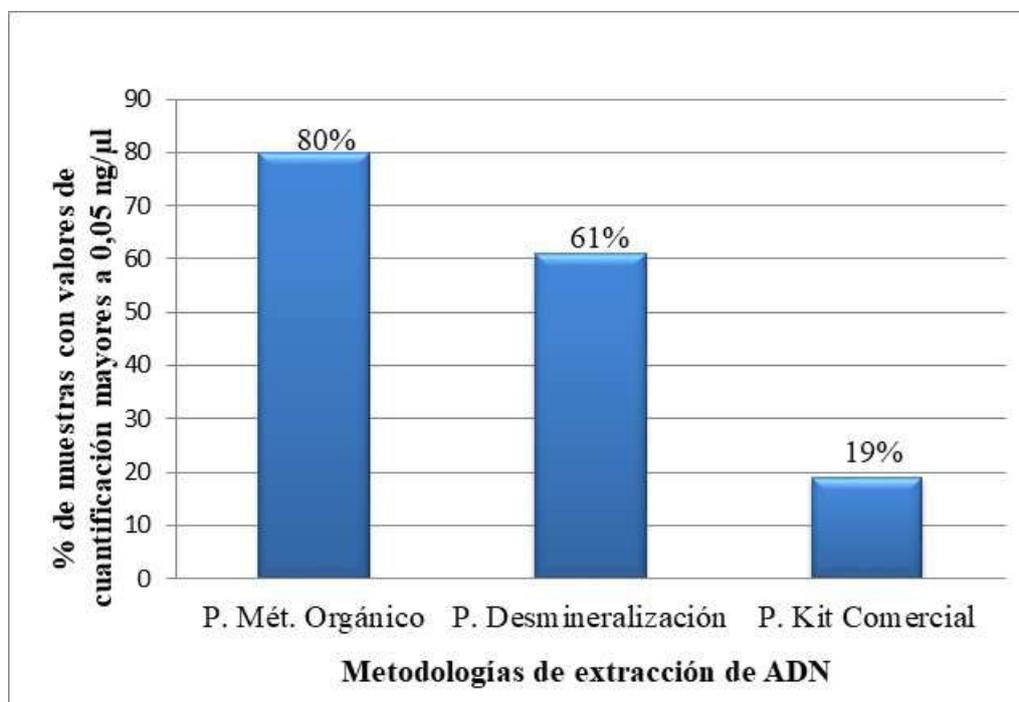
En la figura 16 se observa los resultados obtenidos en la fase de cuantificación de ADN por PCR en tiempo real de las muestras óseas, después de haber realizado la fase de extracción de ADN. Los valores correspondientes a las metodologías de extracción orgánica y de

desmineralización son numéricamente similares entre ambas metodologías y superiores a los valores de cuantificación observados con la metodología de extracción que emplea el Kit de QIAgen®.

La técnica más sensible y representativa para cuantificar ADN, procedentes de muestras forenses, es la cuantificación por PCR en tiempo real, por ello en esta investigación la utilización de esta técnica para la cuantificación en todas las muestras está justificada. Los análisis realizados para evaluar esta variable demostraron que no existe diferencias significativas al emplear los tres métodos de extracción (Tabla 5); sin embargo, la literatura, así como investigaciones a partir de muestras forenses, establecen que los valores de cuantificación mínimos para ser reproducibles deben ser mayor o igual a 0.5 ng/μl. Para este punto del presente trabajo se establece que, tanto el método de desmineralización como el de extracción orgánica obtuvieron un porcentaje considerable de muestras con un aceptable resultado de cuantificación; sin embargo, de acuerdo a la experiencia adquirida en el Laboratorio y a los resultados obtenidos en este trabajo, un gran número de las muestras corridas presentaron valores inferiores a lo mencionado anteriormente y con posibilidades de amplificación.

**Figura 16**

*Porcentaje de cuantificación de ADN por PCR en tiempo real utilizando tres metodologías de extracción*



### 3.4 Eliminación de inhibidores

Para disminuir o eliminar las moléculas inhibidoras de la PCR, presentes en los extractos de ADN de las muestras analizadas, se utilizaron los dispositivos de ultrafiltración señalados en cada metodología propuesta, observándose los resultados de la eliminación en la Tabla 5, donde se indica los valores promedios del ciclo umbral (Ct) del control interno de la PCR (IPC) y concentración de ADN detectada en estas muestras antiguas.

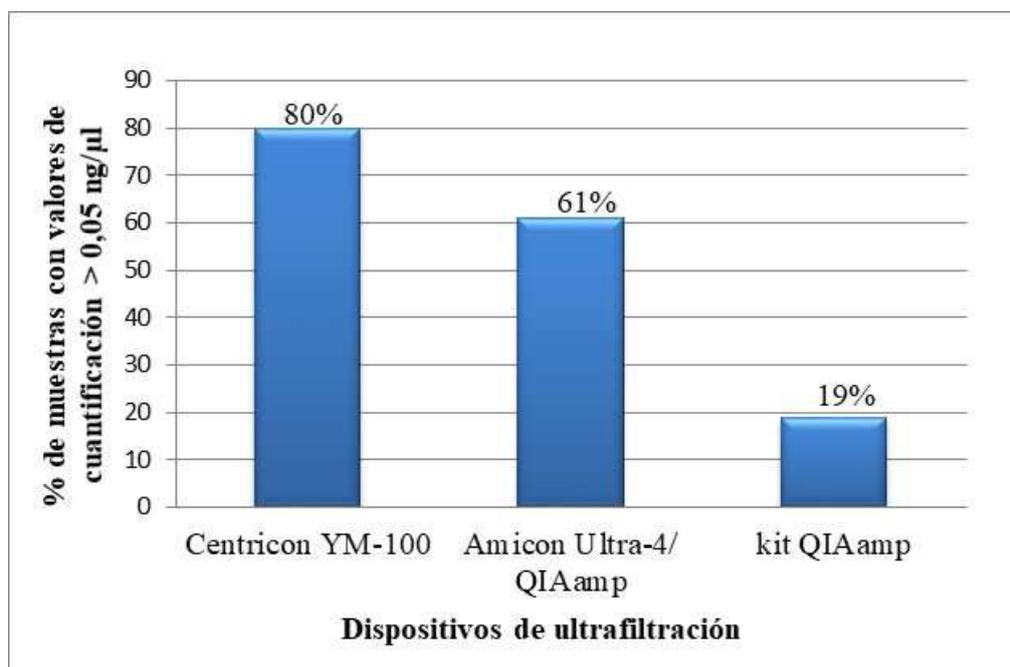
Una reacción de amplificación por PCR en tiempo real puede no darse debido a la presencia de inhibidores de muestras co-extraídas, ADN degradado, cantidad insuficiente de ADN, o la combinación de dos o más de estos factores.

Luego de evaluar los métodos empleados en cada protocolo para purificar el ADN obtenido; resultó que el mejor método en cuanto a su eficiencia para conseguir la eliminación de los inhibidores fueron las columnas de QIAamp® del Kit comercial QIAgen®; ya que al

utilizarlas se consiguió el menor porcentaje de inhibidores presentes en la muestra; sin embargo, con este procedimiento surgió el inconveniente de que al disminuir el porcentaje de inhibidores presentes en la muestra, usando estas columnas, resultó también en la disminución en la concentración de ADN obtenido, lo cual se puede apreciar en la figura 17.

**Figura 17**

*Porcentaje de cuantificación de ADN por PCR en tiempo real utilizando los dispositivos de concentración y/o purificación*



A diferencia de los resultados obtenidos con las columnas QIAamp®, el protocolo de extracción orgánica y el de desmineralización al presentar un resultado similar entre ellos y a su vez mayor en la cuantificación, el protocolo de desmineralización obtuvo el mayor número de extractos con inhibidores; sin embargo, se siguió lo reportado en la literatura al emplear columnas de purificación eficientes como las QIAamp®; así como procesos de purificación adicionales (llamados re-purificación) para incrementar la cantidad de ADN a partir del mismo extracto.

En cuanto a una de las principales funciones que desarrollan las columnas de purificación de ADN para la eliminación de la mayor cantidad de inhibidores presentes en el

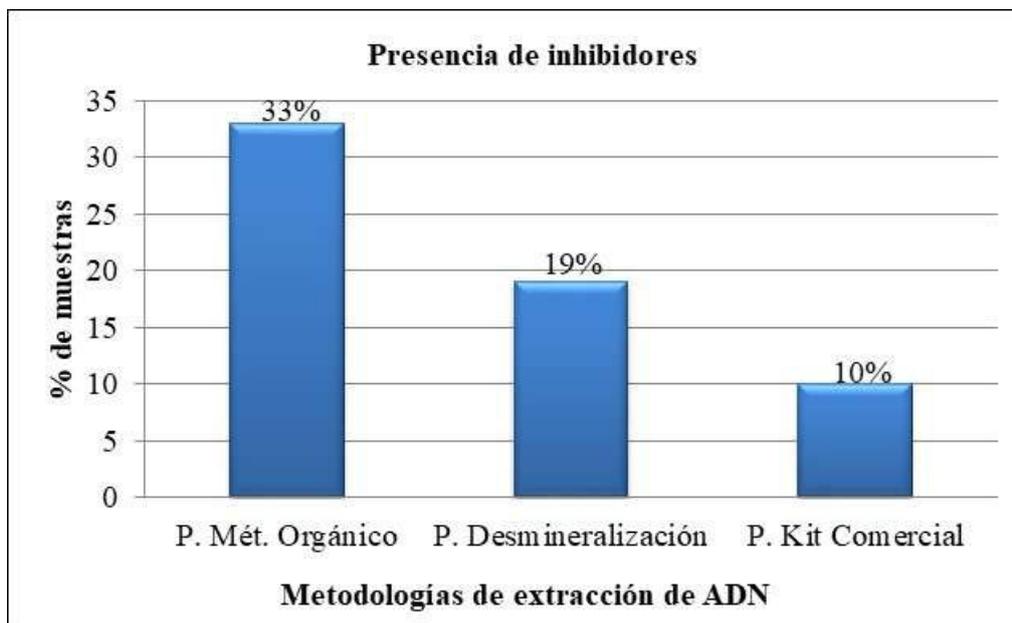
extracto de ADN obtenido, en el protocolo de extracción orgánica y en el de desmineralización, los dispositivos de ultrafiltración que presentaron un menor rendimiento, para eliminar estas sustancias, fueron las columnas Centricon® YM-100, seguidas por las columnas Amicon®, ya que al presentar estos dos protocolos resultados de cuantificación de ADN superiores, era de suponer que dicho resultado esté relacionado proporcionalmente a la presencia de inhibidores.

Teniendo en cuenta la clara relación que existe entre la cantidad de inhibidores de un lugar de entierro y la eficiencia de amplificación de sus muestras, la estrecha asociación que se halló en el presente estudio entre estos dos factores de manera independiente así como la procedencia de la muestra nos indicaría una relación mucho más cercana entre ambos, lo cual se explicaría debido a que los factores que originan la degradación del material genético serían de igual forma los responsables de la generación de moléculas inhibitoras.

Es así que se pudo evidenciar la presencia de inhibidores de la PCR en un mayor porcentaje al utilizar la metodología de extracción orgánica; seguida del protocolo de desmineralización y una menor presencia de inhibidores al emplear el Kit de QIAgen® (figura 18).

**Figura 18**

*Porcentaje de muestras que presentan inhibidores con las metodologías analizadas*



#### IV. CONCLUSIONES

- El estado de conservación de los cuerpos y/o restos esqueletizados influyó decisivamente en la calidad y cantidad de ADN obtenido, por lo que se tiene que considerar los factores que afectan a la calidad de las muestras.

- La metodología de desmineralización evidenció ser adecuada para la extracción de ADN a partir de este tipo de muestras antiguas, lográndose obtener mejores resultados que con las otras dos metodologías estudiadas.

- Luego de la extracción de ADN, el método de purificación por ultrafiltración utilizado, llega a ser decisivo para que el proceso de recuperación y limpieza de inhibidores del ADN sea realmente exitoso.

- Ante la presencia de inhibidores, estos son eliminados con una de las dos metodologías planteadas basados en columnas de sílica, comprobándose el éxito de eliminación de los mismos mediante los análisis del IPC en el real time PCR 7500. Hoy podemos afirmar que son varias las técnicas que han sido empleadas para combatir estos inhibidores con un débil éxito, donde el método basado en columnas de sílica y buffers comerciales es el que evidencia mejores resultados.

- Cuanto menor sea el diámetro de poro en las columnas de concentración y purificación, mejor será su rendimiento en función de la concentración de ADN, evitando así la pérdida de dicha molécula durante el proceso de ultrafiltración. Al presentar un sistema de funcionamiento y filtración diferente, las columnas Amicon® Ultra-4® presentan un rendimiento inferior a las columnas Centricon® YM-100, en cuanto a la cuantificación de ADN.

## V. RECOMENDACIONES

- Este tipo de muestras deben ser colectadas con el apoyo de los genetistas forenses. En toda circunstancia minimizar la contaminación ya sea en el momento de individualización o por el contacto entre los restos.

- Cuando se dispone de varias muestras es recomendable seleccionar la que presente un aspecto liso y sano, es decir que no tenga lesiones como fracturas, osteólisis, escamación, pigmentación anómala, decoloración, entre otras características diferentes.

- Los análisis de las muestras provenientes de un desastre masivo o casos de lesa humanidad, deben de analizarse en laboratorios con experiencia demostrada en trabajos con restos óseos. Esto involucra la necesidad de certificación de los procesos de los laboratorios forenses.

- El uso de agua libre de DNAsas es recomendable ya que disminuye el riesgo de degradación del ADN durante el proceso y protege a su vez la actividad enzimática durante la digestión tisular.

- Para el análisis de muestras óseas de comportamiento difícil se recomienda utilizar el protocolo de desmineralización en sustitución al de extracción orgánica.

- Se recomienda el uso de los dispositivos Centricon® para realizar el proceso de concentración de ADN en muestras de restos óseos, evitando la pérdida de ADN en el análisis.

- Después del proceso de concentración con las columnas Centricon®, se recomienda el uso del Kit comercial QIAamp® DNA Investigator de QIAGEN®, de esta manera lograr que su rendimiento sea más eficiente en la posterior amplificación de los extractos de ADN.

- Realizar pruebas de re-purificación con columnas de sílica del mencionado kit comercial, comúnmente empleadas en investigaciones de este tipo.

- Se recomienda incrementar el número de muestras biológicas de nuevos restos óseos esqueletizados que se encuentren afectados severamente por impactos tafonómicos en la provincia de Huanta.

## VI. REFERENCIAS

- Alonso, A., Andelinovic, S., Martin, P., Sutlovic, D., Erceg, I., Huffine, E., de Simón, L. F., Albarrán, C., Definis-Gojanovic, M., Fernández-Rodríguez, A., García, P., Drmic, I., Rezic, B., Kuret, S., Sancho, M. y Primorac, D. (2001). DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian Medical Journal*, 42(3), 260–6. PubMed.
- Andelinovic, S., Definis-Gojanovic, M., Dermic, I., Galic, M., Ivanovic, J., Rezic, B., Tonkovic, M., y Primorac, D. (1994). DNA technology in identification of war victims in Croatia. *Journal of Forensic Sciences*, 41(5), 891-4.  
<https://doi.org/10.1520/JFS14019J>
- Arroyo, E., Fernández, E., Pérez, A. y Turbón, D. (2003). ADN Antiguo Química y Aplicaciones. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, (p. 27- 37).  
[https://dialnet.Unirioja.es/servlet/fichero\\_articulo?codigo=719047 & orden=0](https://dialnet.Unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=719047 & orden=0)
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (2004). *Current Protocols in Molecular Biology*.  
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mbprefs66>
- Backwell, L., Parkinson, A., Roberts, E., d’Errico, F., y Huchet, J. B. (2012). Criteria for identifying bone modification by termites in the fossil record. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 337-338, 72-87.
- Brkic, H., Strinovic, D., Kubat, M., y Petrovecki, V. (2000). Odontological identification of human remains from mass graves in Croatia. *Int. J. Leg. Med.* 114, 19-22.
- Collins, M., Nielsen-Marsh, C., Hiller, J., Smith, C., y Roberts, J. (2002). The Survival of Organic Matter in Bone: A Review. *Archeometry*, 44, 383-94.
- Del Valle, C. (2002). *Comparación de Tres Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos*. [Tesis de Bachiller Instituto Tecnológico de Costa Rica], San José de Costa Rica.

- Dirkmaat, D. C., Cabo, L. L., Ousley, S. D., y Symes, S. A. (2008). New perspectives in forensic anthropology. *Yearbook of Physical Anthropology* 51:33–52.
- Golenberg, E. M., Bickel, A., y Wiehs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res.* 24:5026.
- González, I., Malamud, S., Martínez, F., Soledad, M., y Pardo, F. (2014). La media prescripción frente al delito de desaparición forzada de personas. ¿Incumplimiento de la normativa internacional en materia de crímenes de lesa humanidad? *Revista Direito GV*, 10(1), 321-346. <https://doi.org/10.1590/S1808-24322014000100013>
- Goodwin, W., y 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).
- Haglund, W. D. y M. H. Sorg. (Eds.) (1997). *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2003). *Metodología de la investigación*. 3. ed. México D.F.: McGraw-Hill. 705 p.
- Hirszfeld, L. y Hirszfeld, H. (1919). Serological differences between the blood of different races. *Lancet* 2: 675.
- Holland, M. M., Fisher, D. L., Mitchell, L. G., Rodríguez, W. C., Canik, J. J., Merrill, C. R., y Weedn, V. W. (1993). Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Viet Nam war. *Journal Forensic Sciences*, 38(3), 542–53.
- Huchet, J. B., Le Mort, F., Rabinovich, R., Blau, S., Coqueugniot, H., y Arensburg, B. (2013). Identification of dermestid pupal chambers on Southern Levant human bones: inference for reconstruction of Middle Bronze Age mortuary practices. *Journal of Archaeological Science*, 40, 3793-3803.

- Huffine, E., Crews, J., Kennedy, B., Bomberger, K. y Zinbo, A. (2001). Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslavia: structure, function, and role of the International Commission on Missing Persons. *Croatian Medical Journal*, 42(3), 271–5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11387637/>
- Iannacone, G. C. (2008). Identificación forense usando ADN genómico y mitocondrial en casos de desastres masivos abiertos y cerrados. *Revista del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses del Instituto de Medicina Legal de Colombia*.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (6422): 709-15. DOI: 10.1038/362709a0
- Lloveras, Ll., Rissech, C. y Rosado, N. (2016). Forensic Taphonomy. En Sanabria, C., Medina (Eds.), *Patología y antropología forense de la muerte* (pp.453- 523). Publisher: Forensic Publisher®.
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D. y Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics* 1(2), 191-5. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
- Lorente, M. (2001). Identification of missing persons: Spanish «Phoenix» Program. *Croat Med J*. 42(3): 267-70.
- Martín, P. (2007). La Identificación Genética de Restos Cadavéricos. *Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses Departamento de Madrid*. [www.fgr.cu/Legislacion/Estudios%20Juridicos%20Espa%F1a/MEDICOS/MEDI22.pdf](http://www.fgr.cu/Legislacion/Estudios%20Juridicos%20Espa%F1a/MEDICOS/MEDI22.pdf).
- Miller, S. A., Dykes, D. D., y Polesky, H. F. (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215-6. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.

- Panizo, L. (2012). Exhumación e identificación de cuerpos: El caso de desaparecidos de la última dictadura militar en Argentina. *Revista Internacional de Ciencias Sociales y Humanidades*, XII (1), 225-250.
- Parra, R. C. (2007). Personas desaparecidas, cuerpos recuperados, víctimas mortales y graves violaciones a los derechos humanos en el Perú. Antes, durante y tres años después de la CVR. *En II Congreso Internacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*, Lima, 10 al 12 de octubre del 2007.
- Primorac, D., Andelinovic, S., Definis-Gojanovic, M., Dermic, I., Rezic, B., Baden, M. M., Kennedy, M. A., Schanfield, M. S., Skakel, S. B., y Lee, H. C. (1996). Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia and Herzegovina by use of standard forensic methods and DNA typing. *Journal of Forensic Sciences*, 41(5), 891-4.
- Stiner, M. C. (2008). Taphonomy. En Pearson, D.M. (Ed.), *Encyclopedia of Archaeology*, 3, 2113-2119. New York: Academic Press.
- Tito, R., López, P., Iannacone, G., y Lizárraga, B. (2004). Genetic Diversity of Sixteen STRs in the Peruvian Mesa Redonda Lima Population. *Journal of Forensic Sciences*, 49(4), 1-2. <https://doi.org/10.1520/JFS2003304>
- Woodward, S. R., King, M. J., Chiu, N. M., Kuchar, M. J., y Griggs, C. W. (1994). Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *Genome Research*, 3(4), 244-247. <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.244>

## **VII. ANEXOS**

### Anexo A. Glosario de Términos

- **ADN.** Abreviatura de ácido desoxirribonucleico. Molécula que consta de dos largas cadenas de nucleótidos dispuestas en forma de espiral formando una doble hélice que contiene la información genética necesaria para el desarrollo y funcionamiento de las células en todos los organismos vivos.
- **ADN Autosómico.** Es el ADN que contiene los veintidós pares de cromosomas no ligados al sexo, presentes en el núcleo de las células.
- **ADN del Cromosoma Y.** ADN que compone el cromosoma Y, presente exclusivamente en los varones. Se transmite del progenitor paterno a sus descendientes varones. Se encuentra en el núcleo de la célula.
- **ADN Mitocondrial.** ADN circular ubicado en el citoplasma celular dentro de las mitocondrias, su ADN está presente con un mayor número de copias y es ideal cuando el ADN del núcleo está dañado o es insuficiente. Este ADN que se hereda exclusivamente por línea materna, de madres a hijos (as).
- **ADN Nuclear.** Se encuentra en el núcleo de la célula, codifica la mayoría de los genes de un organismo. En los análisis de ADN con fines de identificación humana se emplea el ADN nuclear que incluye al ADN autosómico y al del cromosoma Y. El ADN nuclear se encuentra organizado y empaquetado en cromosomas.
- **Descalcificación.** Disminución de las sales de calcio en huesos, sobre todo del trifosfato cálcico.
- **Desmineralización.** Pérdida o disminución del contenido mineral, producto de una disminución o destrucción de las trabéculas óseas, lo que sería consecuencia de una escasa mineralización de las mismas.
- **DTT.** Ditiotreitól, es un potente agente reductor cuyo principal uso es la reducción de enlaces disulfuro entre proteínas. En los protocolos de extracción de ADN a partir de

restos óseos participa en la desmineralización total formando parte de un buffer de lisis.

- **Inhibidores de PCR.** Toda sustancia que puede inhibir la amplificación del ADN mediante la Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR).
- **Marcadores Autosómicos.** Aquellos marcadores que se localizan en los cromosomas autosómicos.
- **Métodos de Cuantificación de ADN.** Todo método que hace posible conocer la cantidad de ADN presente en una determinada muestra biológica.
- **Métodos de Extracción de ADN.** Todo método que permita purificar ADN a partir de una muestra biológica como sangre, saliva, semen, cabello, huesos, prendas usadas, entre otros.
- **Microsatélites (o STR).** Regiones del ADN con secuencias adyacentes cortas que se repiten un número variable de veces y que varían de un individuo a otro. Estos segmentos cortos de ADN repetitivos se los denomina repeticiones en tándem de número variable. Son los marcadores más utilizados en identificación humana en genética forense.
- **PCR.** Reacción de cadena de la polimerasa. Proceso enzimático en el cual una región específica de ADN es replicada o copiada miles de veces a partir de la región original.
- **Perfil de ADN o Perfil Genético.** Detalla la expresión alélica de los marcadores genéticos que se han examinado del ADN ya sea de una persona, indicio o evidencia biológica. Cada marcador genético analizado puede ser expresado con dos números en caso de heterocigosis o con un número si se trata de un caso de homocigosis.
- **PK (Proteinasa K).** Reactivo utilizado para la digestión proteica, de tal manera que las células se lisen y se puedan remover las proteínas que encapsulan al ADN.
- **Primer.** Segmento corto de ADN sintético que sirve para dar inicio y continuar una reacción de PCR (ver PCR).

- **Perfil de ADN Incompleto o Parcial.** Perfil de ADN en el que no se han obtenido resultados para algunos de los marcadores genéticos analizados.

### **Anexo B. Manuales revisados**

- Applied Biosystem. 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Standard Curve Experiments. Getting Started Guide for Standar Curve. Part Number 4387779 Rev. C. 06/2010.
- Applied Biosystem. 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments. Part Number 4387783 Rev. C 06/2010.
- Applied Biosystem. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit USER GUIDE. Publication Number 4391294. Revisión E.
- Applied Biosystem. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit User's Manual. Part Number 4391294 Rev. B 04/2008.
- Applied Biosystem. 7900HT Fast Real-Time PCR and 7300/7500 Real Time PCR Systems. Chemistry Guide. Foster City, CA 94404, U.S.A. Part Number 4348358 Rev. E. 2005.
- Promega. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual. Madison, USA. Part#TM050 (2005).

**Anexo C. Lista de abreviaturas y símbolos**

<b>ADNmt</b>	: ADN mitocondrial
<b>DTT</b>	: Ditioneitol
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetracético
<b>HCl</b>	: Ácido clorhídrico
<b>ICMP</b>	: Comisión Internacional de Personas Desaparecidas
<b>PCR</b>	: Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SDS</b>	: Dodecilsulfato sódico.
<b>STRs</b>	: Repeticiones en tándem cortas
<b>TRIS</b>	: Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UV</b>	: Ultravioleta