



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Análisis y Estandarización del Método “Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas” en la obtención de perfiles genéticos a partir de Restos Óseos.**

**“GENÉTICA FORENSE”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**BIÓLOGO**  
**PRESENTA:**  
**CHÁVEZ GONZÁLEZ CHRISTIAN OMAR**

**Director De Tesis:**  
**M. en C. Mauro López Armenta**

**Asesor Interno:**  
**M. en C. Catalina Machuca Rodríguez**

**Lugar de adscripción: Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO)**



**MÉXICO D.F.**

**MAYO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente investigación se desarrollo en el Laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias Forenses, ubicado en Calle Doctor Liceaga Esquina Niños Héroes 130, Doctores, Cuauhtémoc, 06720 Ciudad de México, D.F. Perteneciente al Tribunal superior de Justicia del Distrito Federal (TSJDF). **Análisis y Estandarización del Método “Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas” en la obtención de perfiles genéticos a partir de Restos Óseos.**

“Oirá el sabio, y aumentará el saber,  
Y el entendido adquirirá consejo,  
Para entender proverbio y declaración,  
Palabras de sabios, y sus dichos profundos.

**El principio de la sabiduría es el temor de Jehová;**  
Los insensatos desprecian la sabiduría y la enseñanza. “

**Proverbios 1: 5-7 (RVR60)**

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradecimiento primero que nada a DIOS por darme la oportunidad de llegar hasta este logro, colocando las personas y las situaciones pertinentes para que esto pudiera ser así, reconozco verdaderamente su mano en cada etapa de mi vida de la cual el siempre ha tenido el control, su amor nunca me ha faltado y el siempre ha estado conmigo, faltan palabras para expresar el agradecimiento simplemente diré **GRACIAS DIOS**.

Así mismo reconozco el apoyo de personas que DIOS ha puesto en mi camino y es por eso que agradezco a mi familia por brindarme ese apoyo durante toda mi vida, Agradezco y Dedico este trabajo a mi padre **Román Chávez López**, a mi madre **Clara González Ortiz**, los cuales me han sabido dirigir, disciplinar y me enseñan a esforzarme para salir adelante ante cualquier adversidad, también me han enseñado a dirigirme rectamente en la vida. Siempre han sido mis superhéroes los AMO.

A mi hermano **Erik Román Chávez González**, a mi hermana **Mónica Paola Hernández Avendaño**, los cuales siempre han sido ejemplo y apoyo a continuar adelante, demostrando que a pesar de que existen situaciones difíciles en la vida nunca estamos solos, siempre existe una esperanza ante todo (DIOS) y siempre sonriendo a la vida.

Más recientemente a mi **sobrino**, que aun siendo muy pequeño trae una sonrisa especial a toda la familia, comprendo que se puede amar sin siquiera conocer a una persona o jamás haberla visto en la vida, eres una bendición para toda la familia, solo espero que puedas experimentar siempre el amor de DIOS.

Agradezco también a todos mis **Familiares y Amigos** que seguramente no podre mencionar a todos por que son muchos sin embargo sepan que están considerados todos aquellos con los que compartí momentos felices, tristes, y de cualquier tipo, agradeciéndoles cada momento que me permiten compartir con ustedes. Agradezco también en especial a mis primos con los cuales he compartido muchas risas y gratos momentos.

Agradezco y Dedico este trabajo a mis maestros que durante mi formación académica han sido participes, siempre dedicando de su tiempo para explicarme las cosas, aclarándome dudas y ayudándome más allá de una formación académica, sino también en una formación como persona.

Agradezco al equipo del Laboratorio de Genética del INCIFO, los cuales siempre me brindaron su apoyo en cada etapa del desarrollo de este trabajo, en ellos puedo ver como DIOS pone a las personas adecuadas en cada etapa, muchas gracias a **Yadira López, Raúl Flores, Mariana Ruiz**, en especial muchísimas gracias a **M<sup>a</sup> Eugenia Ambriz**, que me enseñó a utilizar los instrumentos y equipos del laboratorio cuando desconocía todo por completo, a **Mauro López Armenta**, quien fue mi director de tesis y más que todo un amigo del cual estoy muy agradecido de conocer personas como él, Así mismo agradezco a todos los alumnos con los cuales compartí el laboratorio.

También Agradezco el apoyo de la maestra **Catalina Machuca Rodríguez**, la cual me apoyo con sus sabios consejos durante la realización de este trabajo, al profesor **Alfonso Luna V.**, que brindo opiniones para que el trabajo mejorara. También agradezco al profesor **Carlos Pérez Malvárez**, en el cual puedo ver la verdadera vocación de maestro que está por encima de intereses personales, siempre brindándome ayuda cuando la necesite.

Agradezco a la **UNAM** y en especial a **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z)**, por darme la oportunidad de formarme académicamente y personalmente en sus aulas, Agradezco también el apoyo del **Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO)** por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo en sus instalaciones.

Agradezco a los miembros del jurado **Alfonso Luna Vázquez, Mauro López Armenta, Catalina Machuca Rodríguez, Carlos Pérez Malvárez, María del Carmen García Rodríguez**, por sus atinados comentarios, opiniones y correcciones para enriquecer este trabajo.

Finalmente Agradezco y Dedico este trabajo, a una personita muy especial en mi vida, a mi linda novia **Cecia Jocabed Díaz Salazar y a su Familia**, compartiendo con ella bellos momentos, también momentos difíciles, y agradezco a DIOS por su vida, a ella por entenderme, aguantarme, por comprenderme y por estar conmigo, **TE AMO**.

**Atte: Christian Omar Chávez González**

## Tabla de Contenido

### Titulo

1.-Resumen _____	8
2.-Marco Teórico _____	9
2.1-Genética Forense _____	9
3.- ADN (Ácido Desoxirribonucleico) _____	12
4.- Marcadores Genéticos _____	15
5.- Aplicaciones de la Genética Forense _____	19
6.-Obtención de la muestra _____	19
6.1.-Extracción de ADN _____	21
6.2.- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) _____	23
6.3.- Análisis de Fragmentos _____	25
7.- Restos Óseos _____	27
7.1 Costillas _____	30
8.-Pre-Tratamiento _____	33
9.- Extracción de ADN en restos óseos _____	34
9.1.- Automate Express™ _____	36
9.2.- Fenol/Cloroformo _____	37
9.3.- Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas _____	38
9.3.1.-- Columnas concentradoras _____	39
9.3.2.- Columnas de Silica _____	40

10.- KIT'S _____	41
10.1.- PowerPlex 21 System _____	41
10.2.-Quantifiler® Duo DNA_____	42
11.- Justificación _____	44
12.- Hipótesis_____	46
13.- Objetivos _____	47
14.- Metodología _____	48
14.1.- Método 1: Automate Express™ (Método Automatizado) _____	50
14.2 Método 2: Fenol/Cloroformo _____	52
14.3 Método 3: Desmineralización, Purificación Mediante Silica en Columnas __	54
15.-Resultados _____	60
15.1.- Resultados Cuantificación _____	84
15.2- Pruebas de Tukey y Fisher _____	87
15.3- Costos _____	91
16.- Análisis de resultados _____	93
16.1.-Comparaciones generales entre métodos _____	99
17.- Conclusiones _____	101
18.- Referencias bibliográficas _____	103
19 Glosario _____	108



## 1.- Resumen

El ADN es una de las principales herramientas empleadas en la identificación humana, las limitantes de su uso pueden deberse a condiciones intrínsecas de una muestra, la presencia de agentes contaminantes, cantidad limitada y degradación de la muestra son las principales causas, en el caso de restos óseos estos factores suelen actuar al mismo tiempo, limitando y comprometiendo la obtención de ADN útil para fines de identificación, motivo por el cual todo procedimiento de extracción de ADN en huesos representa un desafío. Los métodos tradicionales para la extracción de ADN a partir de restos óseos con base en fenol-cloroformo son la mayoría de las veces procedimientos largos y laboriosos que consumen semanas, incluso meses. En este trabajo se muestra la extracción de ADN de restos óseos por Desmineralización y Purificación mediante Silica en Columnas, siendo una alternativa más en la batería de métodos de extracción de ADN de restos óseos. El método que se presenta ha sido evaluado junto a los métodos fenol-cloroformo y PrepFiler BTA en equipo Automate Express (Applied Biosystem).

## 2.- Marco Teórico

### 2.1.- Genética Forense

La Ciencia Forense es una disciplina que tiene como objetivo ayudar a los jueces y jurados a resolver cuestiones legales, no sólo en el derecho penal, sino también en los casos civiles. El campo tiene una gran amplitud, que cruza los límites entre Biología, Química, Física, Matemáticas y que incluyen disciplinas tan variadas como Botánica, Balística, análisis de huellas dactilares (Joblin et. al., 2004). La ciencia forense utiliza el conocimiento y el método científico para investigar delitos, la palabra “Forense” proviene del latín y significa “FORO”, la presentación de la información científica en los tribunales. Los expertos forenses estudian pruebas en la escena del crimen o campo, así como en laboratorios (Cooper, 2008).

En el siglo XIX, los funcionarios del gobierno de varios países en Europa concluyeron que las personas que cometieron crímenes en repetidas ocasiones deben ser castigadas con mayor severidad que aquellos que eran delincuentes primerizos. Identificar a las personas que ya habían sido detenidas se convirtió en prioridad. Francis Galton (primo de Charles Darwin) propuso en 1892 que el patrón de las líneas curvas en los dedos de una persona podrían ser utilizados para la identificación. Ofreció pruebas para demostrar que no hay dos personas con las mismas “huellas digitales”, años más tarde Edward Henry, desarrollo una clasificación practica de sistema de huellas dactilares y estas fueron adoptadas por todo el mundo occidental en el año de 1900 (Yount, 2007).

La individualización e identificación humana ha sido siempre un reto en el ámbito criminalístico y forense. Un sistema ideal, debe identificar características únicas de cada individuo, que permanezcan en el tiempo y que permitan la comparación de muestras, indicios biológicos con muestras forenses, la investigación policial y la investigación científica han tenido un mismo objetivo: la búsqueda de la verdad.

En 1900 Karl Landsteiner describió el sistema de grupos sanguíneos ABO y observó que los individuos podrían ser colocados en diferentes grupos en función de su tipo de sangre. A raíz de esto, numerosos marcadores de grupo sanguíneo

y de proteínas de suero en sangre, podrían ser analizadas en combinación para producir alto poder de discriminación. Las técnicas serológicas fueron una herramienta poderosa, pero estaban limitados en muchos casos forenses por la cantidad de material biológico que se requiere para proporcionar resultados altamente discriminantes. Las proteínas también son propensas a la degradación por exposición al medio ambiente (Goodwin et. al., 2011).

Las pruebas biológicas empleadas se han ido perfeccionando con el correr del tiempo. Durante más de medio siglo la determinación entre personas y persona se fundamenta en los clásicos estudios de los grupos sanguíneos ABO. Posteriormente se implementaron marcadores cada vez más informativos tales como los sub-grupos sanguíneos, las proteínas séricas, los antígenos de histocompatibilidad, HLA (antígenos leucocitarios humanos), y finalmente las pruebas de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) (Chieri et. al., 2005).

Una de las disciplinas que auxilian a la ciencia forense es la Genética la cual se define como ciencia multidisciplinaria que abarca los conocimientos de Biología Molecular, Bioquímica y Genética, que se aplican para el análisis de la herencia biológica. La genética forense es una especialidad que engloba las aplicaciones de las técnicas de Genética Molecular, basadas en el análisis de las variaciones del ADN, y su uso en la identificación de individuos/razas/especies con el fin de auxiliar a la justicia en la resolución de casos judiciales. El ADN (Acido Desoxirribonucleico) es el material genético que conforma la información para determinar las características de los individuos.

Los análisis de ADN, se fundamentan en el mismo principio que soporta a otras disciplinas forenses que laboran en el campo de la identificación de personas: “La diversidad humana”. Del mismo modo como el dactiloscopista, el patólogo, el odontólogo o el antropólogo, buscan en el cadáver rasgos anatómicos que puedan constituirse en indicios de identidad, las pruebas genéticas detectan variantes de ADN en las personas, que constituyen códigos de identidad prácticamente individuales, excepto en caso de gemelos idénticos (Paredes, 2009).

El gran paso hacia la Genética Forense se produjo en 1984, cuando Alec Jeffreys (Imagen 1) y su equipo de colaboradores del Reino Unido introdujeron los análisis del ADN (Acido desoxirribonucleico) en la identificación de personas (Mestres et. al., 2012). La Genética Forense vino a revolucionar el proceso de identificación, basándose en el estudio y análisis de fragmentos de ADN presentes en todos los individuos (Ortega et. al., 2009).

En Leicester, Jeffreys estudió cómo el ADN difiere de un ser humano a otro. Las variaciones son leves, que asciende a sólo el 0.1%. Alec Jeffreys no estaba pensando en la ciencia forense cuando llegó a su oficina la mañana del 10 de septiembre de 1984. Como resultado de sus experimentos obtuvo un patrón definido, comparable con los códigos de barras que identifican los artículos en los ordenadores de los supermercados, al ver sus resultados Jeffreys llamó a sus compañeros de trabajo para mirar. El grupo se dio cuenta casi de inmediato, que Jeffreys había encontrado una manera de utilizar el ADN para distinguir una persona de otra. Confirmaron esta idea pinchando sus dedos y utilizando sus muestras de sangre para la prueba, en cada muestra se observó un patrón diferente, el grupo de investigadores utilizó el término de "Huella Genética" para su prueba, en alusión con las huellas dactilares, inmediatamente comenzaron a discutir sobre los usos de esta prueba, pensaron en casos de paternidad, disputas de inmigración, ayudar a identificar víctimas y victimarios en crímenes (Yount, 2007).

El ADN tuvo su debut forense en 1986, en el caso Enderby, que involucraba a dos escolares que habían sido violadas y asesinadas, cuando Jeffreys y su equipo analizaron el ADN del principal sospechoso, no coincidía con el ADN del semen encontrado en ambas víctimas a pesar de la confesión del joven sobre el segundo asesinato, por lo tanto el sospechoso fue liberado, la policía lanzó la primera búsqueda del mundo basada en ADN en la comunidad local. Esto llevó al arresto con éxito del verdadero asaltante el cual fue condenado a cadena perpetua. Posteriormente en el ámbito legal hubo polémica en los juzgados de Estados Unidos sobre la prueba de ADN, sin embargo pese a todo, El resultado de este

debate, culminó con la consolidación de la prueba como un sistema de tipificación seguro y sólido que llegó a ser ampliamente aceptado en los juzgados de todo el mundo (Jeffreys, 2004).

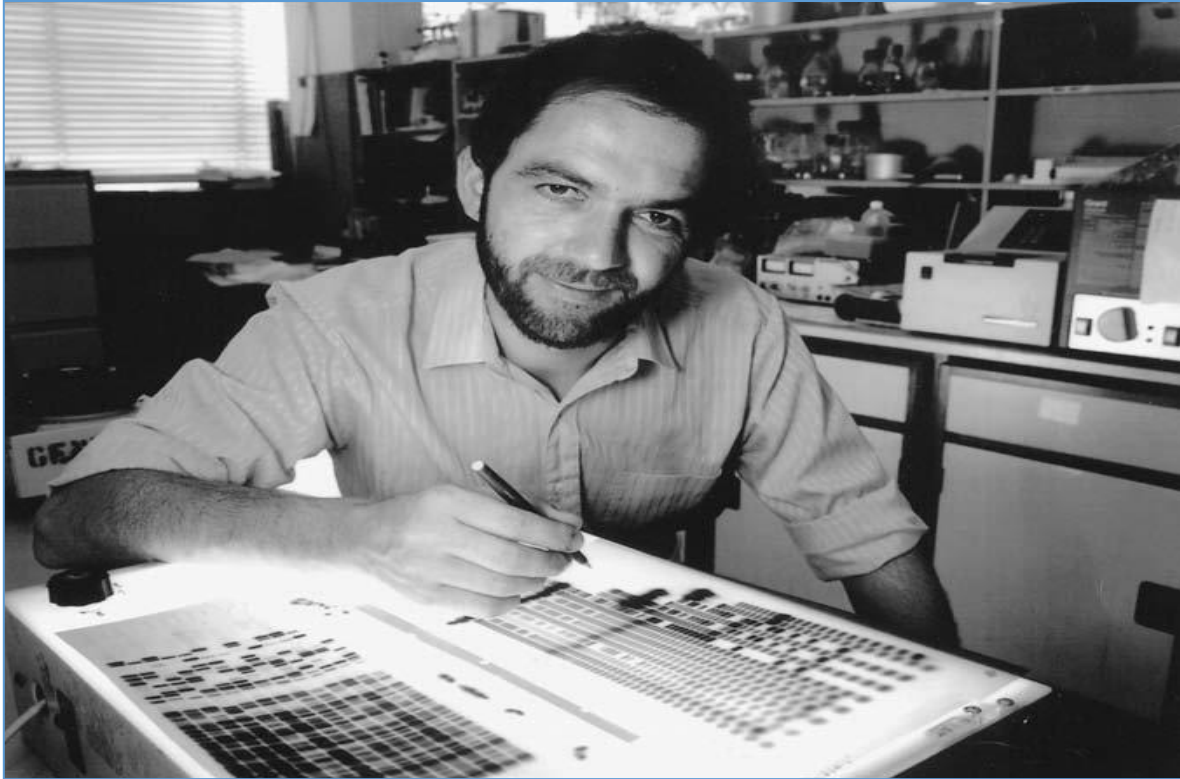


Imagen 1. Alec Jeffreys

### 3.- ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

La unidad básica de la vida es la célula, la cual es como la producción de una fábrica en miniatura materias primas, energía y capacidad para la eliminación de residuos necesarios para sostener la vida. Se requieren miles de proteínas diferentes, llamadas enzimas para mantener estas fábricas celulares en operación. Un ser humano se compone de aproximadamente 100 billones de células, todas las cuales se originaron de una única célula, por ello cada célula contiene la misma información genética. Dentro del núcleo de las células existe una sustancia química conocida como ADN que contiene la información para la replicación de la célula así como la construcción de enzimas necesarias, El ADN reside en el núcleo de cada una de las células (Butler, 2005).

En 1953 James Watson y Francis Crick (Imagen 2) presentaron un modelo tridimensional de la estructura del ADN, esto fue el verdadero inicio de la Biología Molecular, la importancia de este hecho se debe, por un lado a que es la molécula que trasmite la información hereditaria de generación en generación, y por otro a que la propia estructura muestra como lo logra (Velasco, 2004).

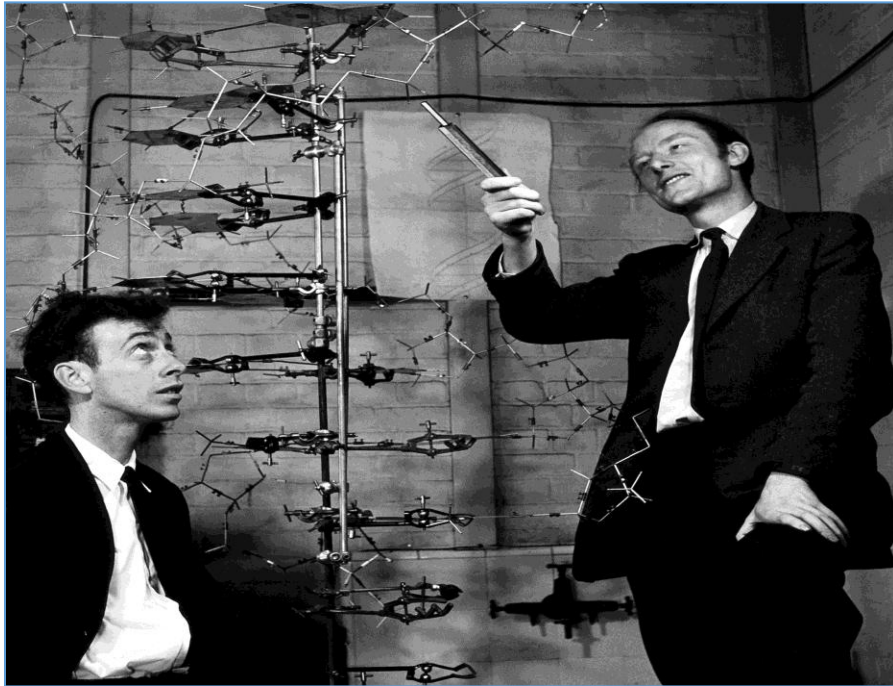


Imagen 2. James D. Watson y Francis Crick

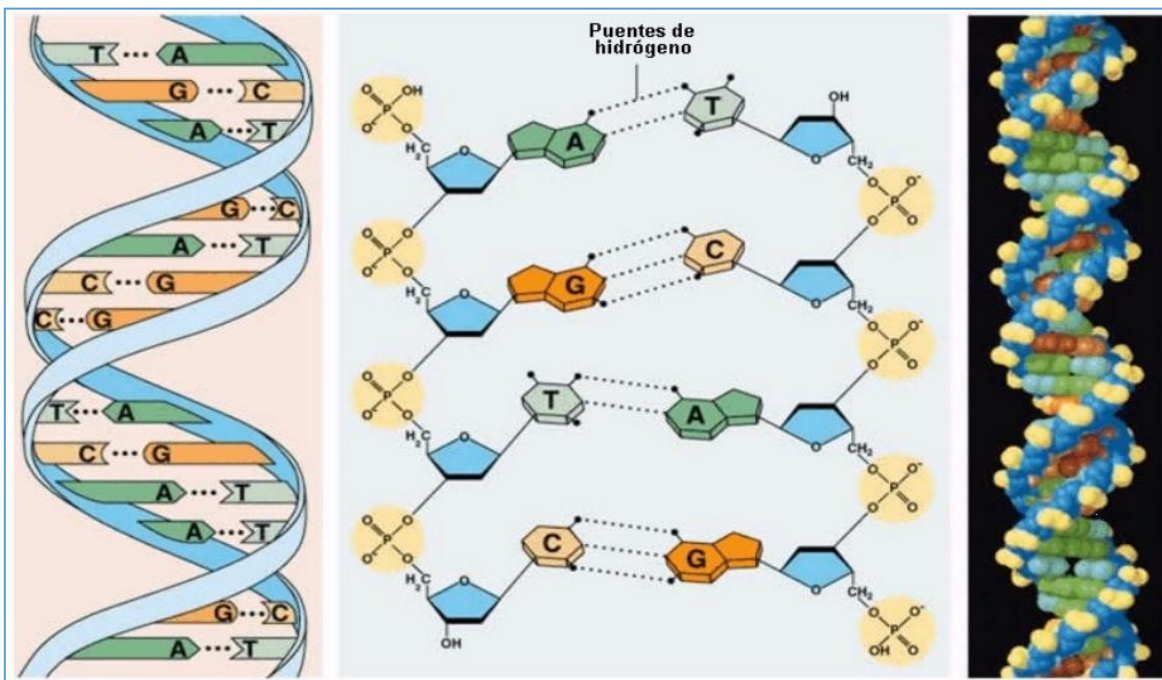
El ADN es un polímero constituido por la unión mediante enlaces químicos de unidades menores llamadas nucleótidos, el nucleótido es la unidad estructural repetitiva del ADN. Cada uno de estos nucleótidos están compuestos por tres elementos más pequeños, (1) un fosfato, (2) un azúcar (Desoxirribosa), (3) una base nitrogenada. Hay cuatro bases nitrogenadas diferentes que se refieren a la letra de su nombre y son A (adenina), T (timina), G (guanina) y C (citosina). (Kobilinsky et. al., 2007).

Su estructura molecular se conoce como modelo de la doble hélice (Esquema 1), es decir está formado por dos cadenas de nucleótidos, unidos covalentemente a

través de uniones fosfodiéster, de aspecto semejante a una escalera doblada (escalera de caracol). Los nucleótidos están unidos por puentes de hidrogeno entre sí, la A (Adenina) siempre se une a T (Timina) mediante dos enlaces de hidrogeno, mientras que G (Guanina) se complementa con C (Citocina) por medio de tres enlaces de hidrogeno. Además, las cadenas presentan polaridad, es decir, existe un extremo 5' con un grupo fosfato terminal y un extremo 3' con un -OH libre del azúcar.

La Molécula de ADN tiene características especiales debido a su estructura algunas de ellas sobre la cadena es que son:

- Antiparalelas: Es decir coincide el extremo 5' de una cadena con el 3' de la otra, esto es porque el azúcar está orientada en sentidos contrarios
- Complementarias: Las bases se encuentran hacia el interior, con arreglo por pares de bases (pb) , A-T y G-C, unidos por puentes de hidrogeno.



Esquema 1. Estructura de la molécula de ADN.

El Genoma humano está localizado principalmente en el núcleo de la célula, sin embargo también una pequeña parte se localiza en la mitocondria. El ADN nuclear se encuentra formando parte de los cromosomas. Una célula diploide contiene 23 pares de cromosomas: 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (X y Y). Cada uno de los cromosomas de un par proviene uno del padre y otro de la madre. Los 23 cromosomas contienen un total 3 mil millones de pares de bases aproximadamente (Juvenal et. al., 2001).

El ADN se puede dividir en dos grandes grupos de acuerdo a su funcionalidad. El ADN codificante y el no codificante. El ADN codificante se calcula corresponde al 10% del ADN total codificando para aminoácidos y proteínas, el 90% restante se conoce como ADN no codificante. Las características generales del ADN no codificante lo hacen especialmente útil para su aplicación en la identificación en Genética Forense. El ADN no codificante presenta una gran variabilidad de un individuo a otro, estas secuencias no son conservadas, pues sus cambios no afectan a la fisiología del individuo. El ADN no codificante se puede dividir en ADN repetitivo en Tándem que representa el 10% y en ADN repetitivo disperso” (Ortega et. al., 2009).

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades radica en el 0.1% de variación (Checa, 2007).

#### **4.- Marcadores Genéticos**

El ADN Repetitivo en Tandem está disperso en todo el genoma humano, debido a que estas secuencias se encuentran entre genes, estos pueden variar de tamaño de persona a persona sin inferir daño en la salud del individuo. Estas secuencias repetidas de ADN son designados por la longitud de la unidad de repetición central y el número de repeticiones contiguas (polimorfismos de longitud). Estas regiones se refieren a menudo como ADN satélite.



Para poder conocer que una muestra pertenece a una persona y no a otra, no es necesario secuenciar todo el material genético contenido en el ADN, basta con obtener un grupo concreto de secuencias para el cual se necesitan marcadores específicos. Estos marcadores se sitúan en las zonas de polimorfismo entre individuos, sólo el 0.1% del ADN es lo que individualiza a una persona (Rodríguez et. al., 2010).

El polimorfismo se refiere a la ocurrencia de alelos múltiples en un marcador, donde al menos dos alelos aparecen con una frecuencia  $>1\%$  en la población general (Checa, 2007). Existen dos tipos de polimorfismos y son conocidos como polimorfismos de secuencia y polimorfismos de longitud (Rodríguez et. al., 2010).

Los primeros marcadores utilizados en genética forense fueron los denominados RFLPs (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, por sus siglas en inglés). Alec Jeffreys utilizó estos marcadores ya que descubrió la existencia de unas regiones mini satélites muy variables dispersas por el genoma humano que al ser tratadas con enzimas de restricción generaban fragmentos de longitud variable. Estudios posteriores demostraron que las diferencias en el tamaño de estos fragmentos se debían a que estas regiones consistían en un determinado número de repeticiones en tándem de una secuencia central, la cual variaba de unos individuos a otros (Velasco, 2004).

La identificación de los fragmentos (RFLPs) requiere el uso de geles de electroforesis que permitan separar los fragmentos que difieren en tamaño, una de las limitaciones de esta técnica es que únicamente identifica dos alelos por locus, otras desventajas son que se requiere una alta cantidad de ADN ( $<10\text{ng}/\mu\text{l}$ ), el procedimiento es lento en comparación con los métodos actuales, la utilización de radiactividad introducía altos costos y sobre todo problemas de bioseguridad para el personal.

Posterior a estos marcadores (RFLPs), se comenzaron a utilizar los VNTR (Número Variable de Repeticiones en tándem, por sus siglas en inglés), estos marcadores son polimorfismos originados por pequeñas secuencias de ADN (400pb -1000pb) que están repetidas en tándem. El número de repeticiones es diferente en los individuos de la población, por lo que en un principio pueden existir más de dos alelos diferentes para cada marcador (aunque cada individuo solo cuenta con dos alelos).

En la actualidad los marcadores más utilizados en Genética Forense son los STR's (Repeticiones Cortas en Tándem, por sus siglas en inglés) los cuales son polimorfismo de longitud variable.

Los marcadores del tipo STR's se les conoce como microsatélites debido a su tamaño, estas secuencias son unidades de repetición que van de 2 pares de bases a 7 pares de bases, se han convertido en marcadores populares debido a que son fácilmente amplificados (Butler, 2011).

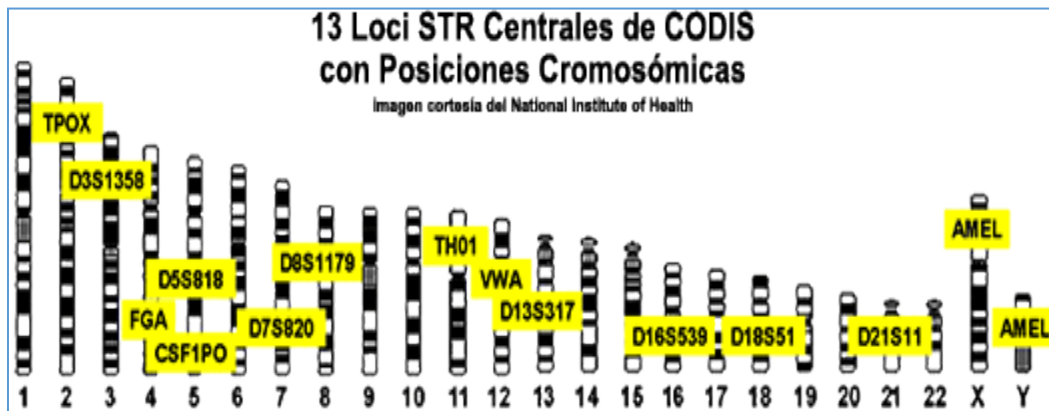
Para fines de identificación en humanos es importante tener marcadores de ADN que presentan la mayor variación posible, esto para tener la capacidad de discriminar entre muestras, las muestras forenses a menudo son un reto para el análisis, tal es el caso de mezclas las cuales son problemas frecuentes, un ejemplo de ello es en agresiones sexuales en los cuales existe la mezcla entre víctima y victimario (Butler, 2011).

Los marcadores STR se ubican en segmentos no codificantes para proteínas u funciones biológicas, ni tampoco para características fenotípicas. Los alelos son heredados de padres a hijos cada par proviene de un alelo materno y un paterno, una persona es heterocigoto para un STR particular, si los alelos maternos y paternos son diferentes, la persona es homocigota para este marcador (STR) si los alelos maternos y paternos son iguales. Las diferencias detectables en los STR son causados por variaciones en los tamaños creados por el número de repeticiones de las unidades de las bases (Kobilinsky et. al., 2007).

El número de repeticiones en los estos marcadores (STR's) los hace altamente variables entre individuos lo cual hace que estos, sean eficaces para fines de identificación humana, miles de microsátélites polimórficos se han caracterizado en el ADN humano, estos marcadores se encuentran dispersos por todo el genoma y ocurren en promedio cada 10,000 nucleótidos (Butler, 2011).

El pequeño tamaño de los STR (100pb - 450pb) los hace mejores candidatos que los marcadores RFLPs y VNTRs en casos donde se utilizan indicios pequeños, o con ADN degradado el cual es algo frecuente en casos forenses.

El FBI (Oficina Federal de Investigación por sus siglas en ingles) determino que con 13 marcadores genéticos (Esquema 2) son suficientes para lograr la identificación positiva de una persona.



Esquema 2. Ubicación Cromosómica de los 13 marcadores empelados por el CODIS

Los marcadores del tipo STRs, son los de utilización para este estudio, El análisis de estos ha permitido establecer que son elementos extraordinariamente útiles en la identificación humana y en el mapeo genético, debido a su elevado polimorfismo (gran poder de discriminación), tasa de mutación relativamente baja, tamaño pequeño y ubicación cromosómica establecida (Rodríguez et. al., 2010).

## 5.- Aplicaciones de la Genética Forense

Desde el descubrimiento de Alec Jeffreys, la Genética Forense, ha estado presente en casos legales, sin embargo dentro de la misma existen casos particulares donde se aplica de diferentes maneras y situaciones únicas.

El trabajo de un genetista forense varía dependiendo del laboratorio y el país en que trabaje, debido al estudio que se requiera, puede ir del análisis de material recuperado en una escena de crimen, pruebas de parentesco, identificación en restos humanos, inclusive puede realizar análisis de ADN en plantas, animales, insectos entre otros microorganismos (Goodwin et. al., 2011). Esto implica que cada laboratorio o personal del laboratorio tenga que lidiar con diferentes casos forenses, todos ellos encaminados a la identificación.

La Genética Forense es aplicable en diferentes situaciones tales como:

- a) Pruebas de paternidad, vinculo familiar, casos filiales etc.
- b) Auxiliar en la resolución de delitos (violaciones, asesinatos, robos, etc.).
- c) Identificación de personas a través de restos orgánicos humanos (sangre, semen, saliva, cabello, dientes, restos óseos, etc.)

En Genética Forense una de sus aplicaciones se encamina a la identificación de personas mediante restos óseos, en esto se basa el presente trabajo, analizando dos métodos de obtención de perfiles genéticos a los cuales se recurre frecuentemente en los laboratorios y así mismo proponiendo un método alternativo para la obtención de dichos perfiles en restos óseos.

## 6.- Obtención de la muestra

Los procedimientos de obtención de muestra que van desde el levantamiento hasta la llegada al laboratorio, son cruciales para poder obtener un perfil genético, así que se deben manejar de manera adecuada cualquier muestra, posible fuente de ADN.

La manera adecuada para el manejo de cualquier muestra biológica incluye, primero la protección del perito que deberá usar, bata, guantes, cofia, cubrebocas, lentes de protección, contar con material estéril para el levantamiento de las muestras, los restos humanos deben de ser remitidos a los expertos forenses (médico, patólogo, antropólogo, odontólogo, genético, criminalista etc.), quienes además del estudio correspondiente, pueden auxiliar en seleccionar y tomar las muestras aptas para el análisis de ADN.

Tras la muerte de una persona, su ADN comienza a degradarse y a disgregarse en pequeños fragmentos. Si la degradación del ADN es extensa, el análisis se hace muy difícil e incluso imposible, La degradación depende en gran medida de lo que sucede con el cuerpo después de la muerte, puesto que los ambientes cálidos y húmedos son particularmente destructivos, los ambientes fríos y secos ayudan a preservar el ADN (CICR, 2009). Existen diferentes protocolos a seguir dependiendo de las situaciones particulares de cada levantamiento.

En muchos casos, cuando se tarda en recuperar los restos humanos, los elementos óseos suelen ser lo único que queda para obtener las muestras, al extraer este tipo de muestras es preciso utilizar técnicas arqueológicas y antropológicas apropiadas, en muchos casos, debido a la recuperación incompleta y la mezcla de restos, se complica el análisis de ADN y se puede perder la oportunidad de identificar los restos óseos (CICR, 2009).

El estudio del lugar de los hechos y la recuperación de los cadáveres cuando se encuentran expuestos, o inhumados ilegalmente, requieren de la aplicación de técnicas y procedimientos arqueológicos. No siempre es posible que en el caso de restos óseos sea el antropólogo forense quien pueda presentarse en el lugar del hallazgo y levantar dichos restos, lo más frecuente es que los restos sean hallados accidentalmente en diversos lugares tales como la playa, al borde de un camino, en un bosque, en una cueva, algún terrero, en el pantano etc. El levantamiento de los restos óseos debe ser completo, esto quiere decir que deben recogerse todos los restos por pequeños que estos sean (Reverte, 1999).

En ocasiones se tienen ideas equivocadas acerca de la obtención de perfiles genéticos, y se llega a creer que los errores cometidos durante el levantamiento y traslado de la muestra se pueden corregir en el laboratorio cosa que no es del todo cierta ya que un mal manejo de muestra puede impedir toda posibilidad de obtener resultados exitosos. La muestra se comienza a trabajar desde este punto, en el laboratorio la muestra puede tener un proceso de pre-tratamiento, esto para evitar en medida de lo posible la contaminación y poder trabajar la muestra de mejor manera, es de importancia que todos los restos óseos pasen por este procedimiento.

De manera general una muestra en Genética Forense se trabaja de la siguiente forma, a partir de la recepción de la muestra en el laboratorio.

- Recepción de la muestra en el laboratorio.
- Extracción de ADN.
- Cuantificación del ADN (PCR, Tiempo Real).
- Amplificación (PCR, Punto Final).
- Análisis de Fragmentos (Electroforesis Capilar).

### **6.1.- Extracción de ADN**

El primer paso para cualquier tipo de prueba de ADN es aislar el ADN y separarlo de los otros componentes de la célula, un procedimiento conocido como extracción. El método particular de extracción empleado depende del tipo de muestra que se recoja, así como la cantidad de ADN que contiene y los métodos por los cuales se analizará (Kobilinzy et. al., 2007).

Existen numerosos métodos de extracción de ADN tales como son Papel FTA, DNAIQ, Columnas de Silica, Fenol/Cloroformo, Chelex, también existen métodos automatizados como Qiacube, Automate Express, Maxwell etc.

Para la obtención del ADN, es necesario provocar una ruptura celular, además de desnaturalizar proteínas así como inactivar enzimas entre las que destacan las nucleasas, este procedimiento puede efectuarse de diferentes maneras entre las cuales están la ruptura mecánica (trituration, maceración), el tratamiento químico (detergentes, sales caotrópicas, etc.), y la digestión enzimática empleando enzimas como la proteinasa K.

El objetivo durante este paso es recuperar y aislar ADN, sobre todo cuando la muestra tiene cierto tipo de degradación e inhibidores (sales, ácidos húmicos, fenoles, etc.).

De manera general los pasos que se siguen en este proceso son:

- Liberación de los ácidos nucleicos de la muestra obtenida.
- Protección del ADN, teniendo cuidado de los reactivos utilizados para la purificación.
- Eliminación de inhibidores para la amplificación como pueden ser lípidos, proteínas, algunas sales, etc.
- Se puede añadir un paso más a este, la concentración de la muestra por reducción e volumen, aunque no siempre se realiza.

La importancia del proceso de obtención y purificación del material genético es recuperar con alto rendimiento ADN de alto peso molecular libre de proteínas, e inhibidores. EL ADN de alta calidad es un pre-requisito para su uso en técnicas de Biología Molecular (Rada, 1998). Tal es el caso de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), en donde la presencia de distintos inhibidores puede impedir la reacción.

## 6.2.- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Los avances tecnológico y científicos han posibilitado, obtener mejores resultados de diferentes casos para la obtención de perfiles genéticos de diferentes restos orgánicos aplicados a genética forense, uno de estos avances y uno de los más importantes fue a mediados de los 80's, cuando Kary Mullis, desarrollo una técnica llamada PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), con la cual se hizo acreedor al premio nobel de química (Rodríguez et. al., 2004).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos de tiempo y temperaturas de incubación, en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Rodríguez et. al., 2004).

La PCR permite la amplificación específica y exponencial de una región de ADN predeterminado mediante el uso de dos pequeños fragmentos, diseñados específicamente de ADN (primer's) que forman los dos extremos de la molécula de ADN a amplificar. Los primer's en PCR comprenden secuencias de nucleótidos específicas que están diseñadas para hibridar con la hebra de ADN, los primer's tienen que ser precisamente complementarios a las secuencias de amplificación. La PCR usa dos primer's cada uno diseñado para cada hebra de la cadena de ADN a amplificar, así que la amplificación se da en ambas direcciones (van Pelt et. al., 2008).

Para que se lleve a cabo una PCR de punto final es necesario simular lo que sucede en la célula al sintetizar ADN, así que para esto se utiliza un tubo en el cual se encontraran: ADN molde (ADN que se quiere amplificar), dNTPs (Cuatro Desoxirribonucleotidos Trifosfatados), Primer's (También llamados iniciadores, cebadores, oligonucleótidos, etc.), solución amortiguadora de pH, MgCl<sub>2</sub> o KCl, y agua estéril libre de nucleasas para lograr el volumen deseado para la reacción.



La PCR se da en tres fases principalmente a los cuales se les conoce como desnaturalización, alineamiento y extensión. Estos pasos se llevan a cabo en un termociclador el cual es una maquina, que complementa mediante diferentes temperaturas y periodos de tiempo el proceso para la amplificación de ADN.

La primer etapa de desnaturalización se lleva a cabo de 94- 96°C, Durante el cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas, El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de cadena simple que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria (Rodríguez et. al., 2004).

La etapa siguiente llamada alineamiento, los primer's se unen a su secuencia encontrada en el ADN molde, para ello la temperatura debe descender entre 40-72°C, permitiendo así el alineamiento, los puentes de hidrogeno estables se forman cuando el ADN molde y los primer's tienen secuencias similares, La polimerasa inicia la amplificación en el sitio flanqueado por los primer's y va en un sentido 5' a 3', de esta manera ambas hebras del ADN funcionan como molde para la amplificación de la cadena.

La última etapa conocida como extensión suele llevarse a 72°C, a esta temperatura la polimerasa alcanza su punto máximo de actividad y continua la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya estaban alineados con anterioridad, se suele dar más tiempo a esta temperatura para asegurar que todos los productos se hayan amplificado.

Con el avance de la tecnología además de la PCR común conocida como PCR de punto final, hoy en día es posible contar con otra modalidad, la PCR en tiempo real. El objetivo de la PCR en tiempo real es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción pudiendo monitorearla prácticamente en tiempo real, motivo por el cual debe su nombre. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de

ADN en las muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco (Tamay et. al., 2013).

Los marcadores STR se utilizan con esta técnica (PCR) por lo cual esto ha permitido su popularidad en los laboratorios forenses en México, además de esto existe una variante de PCR en el que dos o más regiones de ADN específicas se amplifican simultáneamente en la misma reacción a esto se le llama PCR Múltiple, esta variante de PCR fue la empleada en la presente investigación.

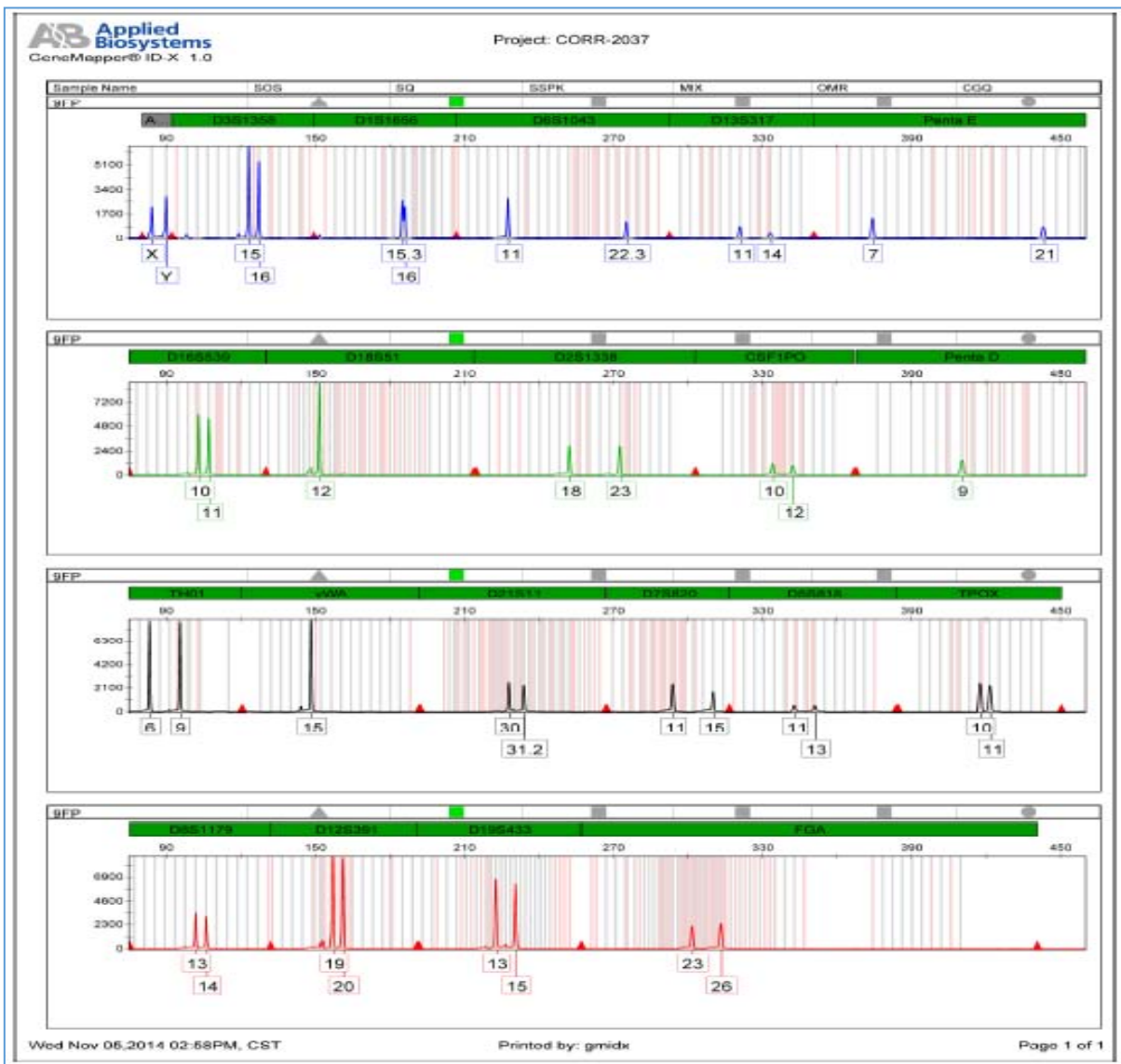
### **6.3.- Análisis de Fragmentos**

Hoy en día, además, un aspecto crucial de la investigación genética es la determinación de pequeñas variaciones entre individuos, lo que requiere el análisis de una misma región en distintos individuos. Por lo tanto, los métodos actuales de determinación de las secuencias de nucleótidos de un fragmento de ADN son muy variados, y los desarrollos tecnológicos recientes han dado lugar a un gran abanico de técnicas diseñadas para responder distintas necesidades. (Novo, et. al., 2007).

Un método de análisis de fragmentos para el ADN es el de electroforesis capilar (Esquema 3), el cual emplearemos en este trabajo, La electroforesis se define como el desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones), sustancias neutras o migración pasiva, por atracción o repulsión en un campo eléctrico (Miguel, 2000).

En esta técnica la mezcla de reacción (productos de PCR) va pasando por unos finos capilares que contienen una matriz porosa capaz de separar fragmentos de ADN que se diferencian en tamaños de tan solo un nucleótido, el resultado es que todos los fragmentos de la mezcla de reacción, son ordenados por tamaños, comenzando por el más corto. También se sitúa una fuente de luz (habitualmente un laser) que excita los fluorocromos y produce un tipo de fluorescencia específico de cada ddNTP.

El Sistema Applied Biosystems 3130 es un Analizador Genético de ADN fundamentándose en la electroforesis capilar, que dispone de un sistema automático de llenado y alineamiento de los 4 capilares, de inyección automática y de software de análisis específico. El equipo totalmente controlado por ordenador, utiliza la técnica de marcaje del ADN con múltiples fluorocromos y es capaz de realizar Secuenciación de ADN, análisis de fragmentos con los programas de Applied Biosystems: Sequencing Analysis™ y GeneMapper™.



Esquema 3. Perfil Genético analizado en un equipo 3130

## 7.- Restos Óseos

En Genética Forense se trabajan distintos tipos de muestras el presente trabajo se enfoca en la obtención de perfiles genéticos a partir de restos óseos, ya que en ocasiones los restos óseos son la única fuente posible con la que se cuenta para la obtención de ADN, los restos óseos junto con los dientes son la forma de preservación natural más importante del ADN.

Convencionalmente la identificación positiva de restos humanos se había venido realizando mediante el análisis y comparación, radiografías esqueléticas, registro dental, cirugías, lesiones y en ciertas ocasiones por la presencia de marcas únicas. Hoy en día con la ayuda de la ciencia y avances en genética se ha logrado obtener perfiles genéticos de momias egipcias de hace 2400 años, la identificación en restos óseos ha sido valiosa para la identificación de personas en fosas, soldados de guerra fallecidos, atentados terroristas, grandes catástrofes naturales entre otras (Jiménez et. al., 1999).

La Identificación de un cuerpo recién muerto por lo general no es difícil (Imagen 3). Los rasgos faciales, color de pelo, y las huellas dactilares proporcionan pistas. Si un cuerpo ha sido muerto por meses, años o décadas, sin embargo, los restos óseos pueden encontrarse solo en pequeños fragmentos de hueso (Yount, 2007). El avance en la caracterización de ADN a partir de evidencias biológicas ha permitido la identificación exitosa en casos donde los restos humanos solo consistían en huesos.

El esqueleto de un adulto humano está compuesto de 206 huesos nombrados, pero hay aún más en un niño. La identificación de un cráneo humano completo o de los huesos más grandes es relativamente fácil, pero distinguir los pequeños huesos, de los de otros animales requiere más habilidad. Esto puede ser importante cuando se han convertido en restos desarticulados y parciales. No es inusual para la policía ser alertados de la presencia de hueso en algún lugar que posteriormente resultan ser de otra especie, los huesos también pueden proporcionar pistas sobre el tiempo de muerte, la presencia de enfermedades, la

causa de muerte, y con la extracción de ADN la identificación (Gunn, 2006). De igual manera los antropólogos pueden inferir sobre otros aspectos de los restos óseos como son sexo, edad, estatura, lesiones, grupo étnico, entre otras características que pueden ayudar a la identificación.

El hueso está formado de un porcentaje orgánico y otro inorgánico, es decir el hueso no es totalmente mineral, también tiene tejido blando. El componente mineral está compuesto de calcio y fosfatos llamados hidroxiapatita principalmente (alrededor del 70 % del hueso) que se forman en y alrededor de una matriz orgánica que contiene colágeno. El colágeno es similar en consistencia a una gruesa gelatina, relativamente dura. En el hueso vivo y en el hueso que aun es relativamente fresco después de la muerte, la composición de colágeno es significativa, pero como el cuerpo el hueso se descompone, este componente de colágeno generalmente decae antes de que la parte mineral se vea afectada de manera significativa. En gran medida, la forma de un hueso está determinada por su función y la función está determinada por su forma.

Numerosos estudios señalan que el material genético se degrada más rápidamente en tejidos blandos que en huesos debido a la estructura más resistente del hueso que actúa como barrera física frente a las influencias tafonómicas. La densidad del hueso también es un factor importante que influye en su preservación. De este modo, el ADN está generalmente menos degradado en las porciones más densas del esqueleto, como en el fémur y la tibia. Pese a todo existen pocos estudios que hayan valorado las diferencias de las tasas de éxito en obtener un perfil genético entre los diferentes elementos esqueléticos (Barrio, 2012).

El ADN normalmente es resistente a posibles daños ambientales tales como hidrólisis, oxidación y daño químico inducido por la ruptura de enlaces de nucleótidos y radiación ultravioleta. En los organismos vivos, los errores y el daño en las células son corregidos por la reparación enzimática y otros mecanismos celulares. Sin embargo, después de la muerte, el sistema de reparación de las

células deja de funcionar y el ADN empieza a degradarse rápidamente rompiéndose en pequeños fragmentos debido a reacciones de oxidación e hidrolisis. Mucha de la fragmentación ocurre en las primeras horas del deceso antes que el tejido pierda su hidratación. Bajo estas circunstancias, el ADN empieza a absorberse hacia una matriz mineralizada la cual permite escapar de la degradación microbiana. La modificación química del ADN fragmentado es tan extensa que sólo se espera recuperar el 1% de sus moléculas en restos de sitios arqueológicos.

Algunos agentes causantes de esa degradación son las propias enzimas del organismo (Autolisis), la invasión de otros organismos tales como bacterias, hongos, insectos inclusive fauna local como perros, ratas, coyotes, etc. Estos son solo algunos ya que el ambiente juega un papel importante en la degradación del organismo con factores como el clima, temperatura, pH, compuestos propios del suelo, humedad. Inclusive hoy en día el uso de agentes químicos por parte de los criminales sobre los restos humanos, al igual que la carbonización de estos, ello complica la identificación positiva mediante análisis de ADN.



Imagen 3. Restos Óseos remitidos al Instituto.

Las células presentes en el hueso son:

- **Osteoblastos:** son las células que construyen los huesos; sintetizan los componentes de la matriz del tejido óseo e inician en proceso de calcificación. (sufijo blasto indica células que secretan matriz)

- **Osteocitos:** son las células maduras principales del tejido óseo; derivan de los osteoblastos que quedan atrapados en la matriz; intercambian nutrientes con la sangre (sufijo cito indica células constituyentes de los tejidos).
- **Osteoclastos:** son células muy grandes, producen destrucción del hueso por medio de enzimas lisosómicas para permitir el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso (sufijo clasto indica destrucción).

La problemática para la obtención de perfiles genéticos en el ámbito forense se puede resumir en 3 las cuales son:

- Calidad del ADN.
- Cantidad de ADN.
- Contaminantes.

La calidad referente a la degradación de la molécula de ADN debido a la fragmentación de la cadena. En ocasiones la cantidad de ADN es mínimo e inclusive de la muestra, insuficiente para la obtención de un perfil y en situaciones los agentes contaminantes ya sean inhibidores de PCR o ADN exógeno a la muestra. Son problemas comunes en muestras de restos óseos referidos a menudo como muestras problema.

En restos óseos suele ser usual el hecho de que las condiciones del ADN dependen más de los agentes del medio que en referencia al tiempo, sin embargo cada caso presenta situaciones únicas.

### **7.1.- Costillas**

El ADN esta normalmente menos degradado en las porciones más densas del esqueleto, como el fémur y la tibia. Algunas publicaciones sugieren que el ADN esta mejor preservado en clavículas que en costillas, en hueso largos más densos que en elementos menos denso (Barrio, 2012). Sin embargo en el ámbito forense no siempre se puede discriminar en la selección de muestras debido a que

ocasionalmente solo se cuenta con un único indicio, o no es posible echar mano de otra muestra, para el presente estudio se trabajara con restos óseos específicamente costillas.

Las costillas (Imagen 4 ) son huesos planos y curvos, que en su conjunto forman la caja torácica. En general sirven de protección a los órganos internos del tórax, Las costillas humanas son 12 a cada lado, se localizan en el tórax, constituidos por cartílago en la parte media de su vertiente anterior y por hueso en su vertientes lateral y posterior, que conforman la parte más visible del armazón óseo de la caja torácica, dándole un aspecto de jaula, que se articulan con cada una de las doce vértebras dorsales o torácicas por detrás y con el esternón, a través del correspondiente cartílago costal, por delante.

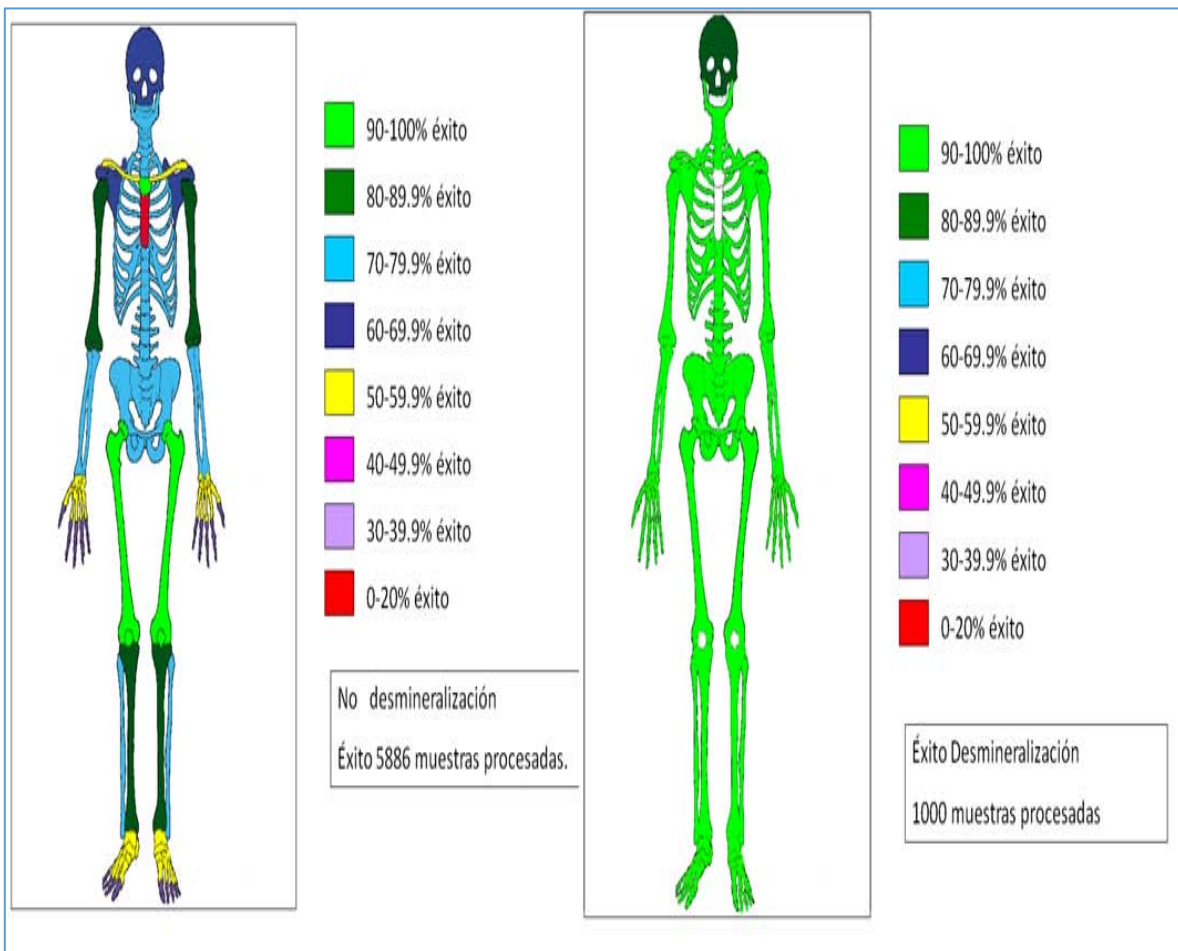
Es importante reconocer las necesidades, las disposiciones y los alcances de cada laboratorio en este caso particular en el laboratorio (Instituto de Ciencias Forenses INCIFO) se remiten muestras biológicas conforme al estado de descomposición del cadáver, en primer instancia se recurre a sangre, posterior a tejido y en casos de avanzado estado de putrefacción o en restos óseos se recurre a costillas.



Imagen 4. Muestras remitidas al laboratorio de genética.



En restos humanos que no se encuentren en avanzado estado de descomposición, las secciones de costillas son una buena fuente de ADN, que puede extraerse con relativa facilidad durante un examen post mortem (CICR, 2009). Además de esto, estudios como el mostrado por el Dr. Michael D. Coble (Esquema 2) (Coble, 2009) demuestran que los restos óseos tratados con desmineralización suelen tener un porcentaje alto de éxito en la obtención de perfiles genéticos.



Esquema 2. Imágenes de comparación entre el uso de la desmineralización para la obtención de perfiles genéticos.

El estudio de ADN a partir de restos óseos incluye las etapas de selección de muestra, **Pre- tratamiento, Extracción, Cuantificación, Amplificación** y finalmente **Análisis de Fragmentos** para obtener el perfil genético.

## **8.- Pre-Tratamiento**

Un alto porcentaje de los problemas que afectan el éxito en la obtención de perfiles genéticos a partir de restos óseos son los contaminantes ya sea ADN exógeno, o inhibidores de la PCR, es por ellos que se buscan alternativas para poder solucionar este problema. Es mejor eliminar la contaminación desde inicio, antes de la extracción de ADN con un pre- tratamiento (Proceso de limpieza al cual se somete un resto óseo, antes de la extracción de ADN) esto con el fin de eliminar contaminantes sobre la superficie de la muestra.

Existen diferentes pre-tratamientos esto para lograr la descontaminación, para el caso de restos óseos algunos de ellos van desde el uso de luz ultravioleta, uso de etanol, detergentes, agua destilada, en algunos casos se llevan a utilizar métodos combinados (Barrio, 2012), inclusive se puede llegar a no utilizar la parte más externa de la muestra para de esta manera evitar cualquier contaminante en la superficie de la misma.

Es importante durante el pre-tratamiento tener consideraciones sobre aspectos fundamentales para el estudio de genética, como el uso inadecuado de sustancias químicas las cuales pueden dañar al ADN y comprometer el estudio, agentes corrosivos como ácidos y álcalis concentrados, exceso de calor o rayos UV, así como tratar en medida de lo posible gastar la cantidad mínima de la muestra ya que es un trabajo interdisciplinario y un único indicio puede requerir la intervención de diferentes disciplinas.

En este trabajo utilizaremos un procedimiento diferente de pre- tratamiento, Brian M. Kemp demostró que el cloro, si es aplicado correctamente puede ser utilizado como un método eficaz para evitar la contaminación de ADN en las superficies óseas, resultados previos han demostrado que el cloro en una concentración de

6% durante 18 horas es adecuado para destruir contaminantes presentes en la superficie de los restos óseos (Kemp 2005).

Es por esto que el pre- tratamiento y la extracción de ADN juegan un papel crucial en la obtención de perfiles exitosos.

Algunas otras recomendaciones para evitar contaminaciones durante el proceso son el uso de material estéril, uso de guantes, cubrebocas, cofia, bata y en general el equipo necesario para poder trabajar en el laboratorio para cada operación específica.

Para que los diferentes procesos se lleven a cabo de la mejor manera se recomienda ampliamente contar con espacios separados para cada tipo de operación, una zona donde se lleve a cabo la extracción, una zona aislada para el proceso de PCR al igual que otra área para el análisis de fragmentos, esto con el fin de disminuir la posibilidad de contaminación por agentes del medio, al igual que el uso de controles negativos y positivos en todas las pruebas realizadas.

## **9.- Extracción de ADN en restos óseos**

La elección de métodos depende en gran parte de la capacidad y alcance del laboratorio, esto es, competencia técnica por parte de los analistas, infraestructura, equipamiento e insumos, por otro lado un método estará en función de las necesidades que un laboratorio pueda tener respecto a la demanda de estudios de restos óseos así como las características con que se suelen recuperar las muestras.

La capacidad de recuperar ADN y el uso de marcadores tipo STR's en restos óseos se ha convertido en una herramienta valiosa para la identificación de personas, sin embargo el uso de estos marcadores (STR's) en restos óseos, puede plantear un desafío debido al daño al ADN de la muestra, a los agentes contaminantes, o a la cantidad de muestra disponible para el estudio. Las alteraciones al ADN en restos óseos suele depender más de las condiciones del medio en donde se encontraban que por tiempo transcurrido luego de la muerte.

Algunos de los procesos utilizados para la obtención de ADN a partir de Restos Óseos son el uso de las técnicas Fenol/Cloroformo, Silica, Chelex, Desmineralización-Silica así como el uso de métodos y equipos automatizados (Barrio, 2012) Uno de estos es el caso del método “PrepFiler BTA” conocido comúnmente como Automate Express™. En este trabajo abordaremos tres de estos métodos: Fenol/Cloroformo, Automate Express™ (Método Automatizado) y el Método de Desmineralización Silica.

Los métodos antes señalados han sido elegidos debido a que fueron evaluados respecto a las capacidades y necesidades del laboratorio en donde se desarrolló esta investigación, se considera cada método por las siguientes condiciones:

Automate Express™: Es una estación de trabajo que permite la automatización del método en extracción de ADN proveniente de hueso, es de las tecnologías más recientes en este tipo de muestras.

Fenol/Cloroformo: Es el método por excelencia en los laboratorios de genética forense en México, ya que es económico, no requiere de equipo especializados y demuestra tener buenos resultados.

Desmineralización-Silica: Se ha demostrado que la desmineralización total en huesos obtiene buenos resultados en rendimiento de ADN, de igual manera que el método Fenol/ Cloroformo no requiere equipos especializados, adecuaciones a la técnica pueden dar los mejores resultados en la obtención de perfiles genéticos.

Las características de los métodos de extracción antes señalados son de manera general las condiciones por las cuales se elige cada uno, sin embargo a continuación se abordan de manera más detallada el fundamento de cada método, así como se acentúan las características por las cuales fueron elegidas.

## 9.1.- Automate Express™

Existen diferentes equipos automatizados que permiten la realización de diversos métodos para la extracción de ADN, algunos equipos son Qiacube, Maxwell, Automate Express™, sin embargo para este estudio se ha optado por utilizar Automate Express™.

Automate Express™ es una estación de trabajo automatizada (Imagen 5) que permite la extracción y purificación de ADN a través del Kit PrepFiler BTA el cual se fundamenta en la adición de proteinasa K y perlas magnéticas las cuales tienen afinidad por el ADN, el cual es lavado y es eluido para llevarse a PCR. Entre sus principales atributos está la capacidad de eliminar inhibidores, la extracción se desarrolla en un ambiente cerrado mediante cartuchos individuales para cada muestra. Además estos sistemas suelen ahorrar mucho tiempo ya que pueden trabajar hasta 13 muestras simultáneas y estar listas en un tiempo de aproximadamente 30 minutos (Applied Biosystems 2010).

Estudios como el de Carey P. concluyen que es fácil el uso de la estación de trabajo (Automate Express™), además resalta la cantidad mínima requerida para la extracción (50mg) y refiere que cumple con las expectativas de recuperación al igual que la limpieza ante inhibidores (Carey 2011).

Se tiene como antecedente que el laboratorio de genética forense más importante de México avocado en procuración de justicia (PGR Procuraduría General de la Republica), cuenta con este equipo, en atención a la violencia que se vive en el país, a fin de responder de forma pronta la resolución de los casos conferidos, las 13 muestras con las cuales puede trabajar el equipo es un factor determinante para su uso en los laboratorios de Genética Forense.



Imagen 5. Estación de trabajo Automate Express.

## 9.2.- Fenol/Cloroformo

El método de fenol/cloroformo es la técnica de extracción de ADN más utilizada en restos óseos, se fundamenta en la adición de Fenol/Cloroformo para desnaturalizar y separar proteínas del ADN así como otros componentes celulares. Lípidos y algunas proteínas quedan en la fase orgánica de la solución, mientras que el ADN se encuentra en la fase acuosa (Del Valle, 2002).

El método Fenol/Cloroformo permite obtener un ADN limpio de lípidos, proteínas y de enzimas. Primero se lleva a cabo una lisis celular, posterior a esto se le adiciona Fenol/Cloroformo, de esta manera los lípidos y proteínas se precipitan, luego un gradiente de gravedad generado por centrifugación da lugar a una fase orgánica y otra acuosa (Imagen 6), la parte acuosa contiene el ADN (Barrio, 2012). Posteriormente se recupera el ADN mediante precipitación alcohólica para luego eluirlo en agua a volumen requerido

Algunas de las ventajas de este método son que no requiere equipo especializado para llevarlas a cabo, se ha probado que tiene buen rendimiento en cuestión de ADN y la pureza con que se obtienen resultados (Barrio, 2012).

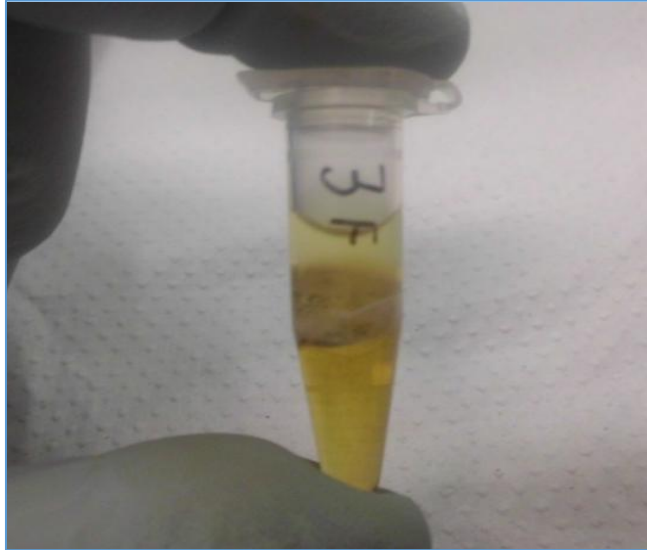


Imagen 6. Muestra tratada con Fenol/Cloroformo

### 9.3.- Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas

La idea de un método alternativo de desmineralización y purificación mediante silica en columnas, es el mejoramiento del protocolo visto en otros estudios, de manera general este método será comparado con el propuesto por Odile M. Loreille (Loreille et al., 2007), lo que se busca con esta modificación es tener un método más fácil y práctico al disminuir cantidades de reactivos que más adelante se especifican, también se busca resultados exitosos en la obtención de perfiles genéticos y que esté al alcance de cualquier laboratorio de genética forense en México.

El método incluye 50mg de polvo de hueso una cantidad pequeña pero suficiente para obtener ADN en cantidad y en calidad para la obtención de perfiles genéticos. Para desbastar el hueso a punto de polvo se pueden utilizar herramientas de fácil

acceso como una lima plana metálica, con la idea de que cualquier laboratorio pueda contar con ella y de esta forma prescindir de equipos de molido.

### 9.3.1.- Columnas Concentradoras

Una de las modificación más importantes es el uso de columnas concentradoras (Imagen 7), las cuales son ideales para concentrar muestras biológicas tales como moléculas de ADN ya sea de doble cadena o cadena sencilla, las columnas tienen capacidad de carga de 4 ml y permiten recuperar volúmenes de 200ul. El uso de estas columnas concentradoras facilita la manipulación de la muestra en cuestión de volumen, así mismo se sugiere la utilización de estas columnas en un tamaño de 100kda para eliminar trazas de ADN de bajo peso molecular (menores a 200 pb) con recuperación óptima para moléculas de tamaño superior al indicado ya que tienen una efectividad del 97% en la recuperación de ADN, de esta forma favorecer la obtención de perfiles genéticos exitosos (Amicon 2011).

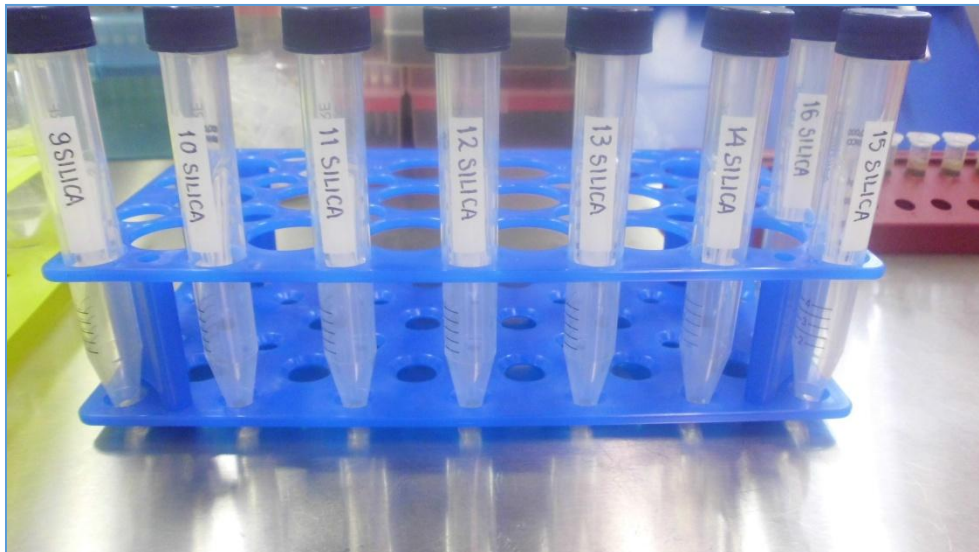


Imagen 7. Columnas Concentradoras Amicon<sup>R</sup> Ultra-0.5 100kda.



### 9.3.2.- Columnas de Silica

Posterior a la concentración de la muestra se procederá a utilizar columnas de base Silica (Imagen 8) para la purificación de ADN, el uso de Silica como método de purificación elimina todas las sales empleadas y presentes en la muestra concentrada, las columnas son las del kit QIAquick (Qiagen).

El kit QIAquick, está diseñado para la limpieza rápida de ADN, en este sistema se combina la comodidad de la tecnología de columnas, que incorpora la Silica en membrana. Las soluciones amortiguadoras especiales, proporcionadas con cada kit están optimizadas para la recuperación eficiente de ADN y eliminación de contaminantes en cada aplicación específica. El ADN se une a la membrana de Silica en presencia de altas concentraciones de sal, mientras que los contaminantes pasan a través de la columna. Las impurezas son eficientemente arrastradas y el ADN puro se eluye con solución amortiguadora. La membrana de Silica está diseñada para eluir el ADN en solución acuosa (QIAquick 2006).



Imagen 8. Kit de extracción de silica en columnas

Lo más importante al analizar un método de extracción es evaluar: Tipo de muestra, Grado de pureza requerida, Cantidad de ADN, Rendimiento, Presencia de inhibidores, Capacidad del laboratorio, Facilidad de uso, Aplicaciones, Tiempo de análisis, Costos entre algunos aspectos propios de cada laboratorio.

## **10.- KIT'S**

Para lograr los objetivos se ha definido la utilización de diferentes kit's presentes en el mercado, el uso de estos kit's se debe a distintos factores los cuales se evaluaron de acuerdo a las necesidades y alcances propios del laboratorio y de los kit's a utilizar. Sin embargo se han elegido porque se espera que con estos kit's, se logran los objetivos planteados en el trabajo.

### **10.1.- PowerPlex 21 System**

Existen muchos kit's comerciales para identificación humana basados en marcadores STR utilizados en Genética Forense, estos kit's se encuentran presentes en el mercado nacional algunos de ellos son PowerPlex 16 (Imagen 9), PowerPlex 21, PowerPlex Fusión, Identifiler, entre otros.

En este estudio se utilizara el Sistema PowerPlex 21 System, que cuenta con 21 marcadores STR's dentro de los cuales se encuentran, los 13 marcadores genéticos que forman el núcleo del Sistema de Índice Combinado de ADN del laboratorio de FBI CODIS (Butler, 2006), de acuerdo con el FBI estos 13 marcadores, son suficientes para lograr la identificación positiva de una persona.

El Sistema PowerPlex 21 System, se utiliza para aplicaciones de identificación incluyendo el análisis forense, pruebas de relación filial y su uso en investigación. El sistema permite co-amplificación y detección fluorescente de cuatro colores de 21 marcadores (20 marcadores STR y Amelogenina), los marcadores son D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, Amelogenina, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX y vWA.

El sistema PowerPlex 21 proporciona todos los materiales necesarios para amplificar regiones STR's de ADN genómico humano, incluye polimerasa termoestable, esto es aplicado durante el proceso de PCR punto final. Para el análisis de fragmentos es compatible con el Sistema Applied Biosystems 3130

(equipo con el cual se cuenta en el laboratorio), así que nos proporciona flexibilidad para su uso dentro del laboratorio.

Además de lo descrito, tiene tolerancia a inhibidores de la PCR, es flexible para trabajar con diferentes tipos de muestras incluyendo muestras problema (Promega, 2011), se utiliza en una PCR múltiple, y un argumento de gran peso en estos estudios es la capacidad del alcance del laboratorio.



Imagen 9. Kit de identificación PowerPlex.

## 10.2.- Quantifiler<sup>®</sup> Duo DNA

El kit Quantifiler<sup>®</sup> Duo DNA (Imagen 10) es un sistema de cuantificación que permite la cuantificación simultánea de la cantidad total de ADN humano amplificable y ADN masculino en una muestra y se lleva a cabo en un PCR múltiple. Es importante conocer la cantidad de ADN presente en una muestra ya que con esto se puede determinar si una muestra contiene suficiente ADN para la obtención de un perfil genético.

El kit funciona con marcadores STR, además cuenta con un control interno con el cual se puede determinar si existen inhibidores presentes en la muestra y que debe requerir una co-purificación adicional antes de PCR.

Los reactivos están diseñados y optimizados para el uso con el equipo de PCR 7500 Real Time Biosystem (equipo con el cual se cuenta en el laboratorio).

Al analizar las cuantificaciones se debe ingresar una curva estándar con concentraciones conocidas para la comparación de los resultados. Su intervalo de sensibilidad es muy amplio ya que puede detectar desde 23pg/ul hasta cantidades que superen los 100ng/ul (Quantifiler Duo 2012).

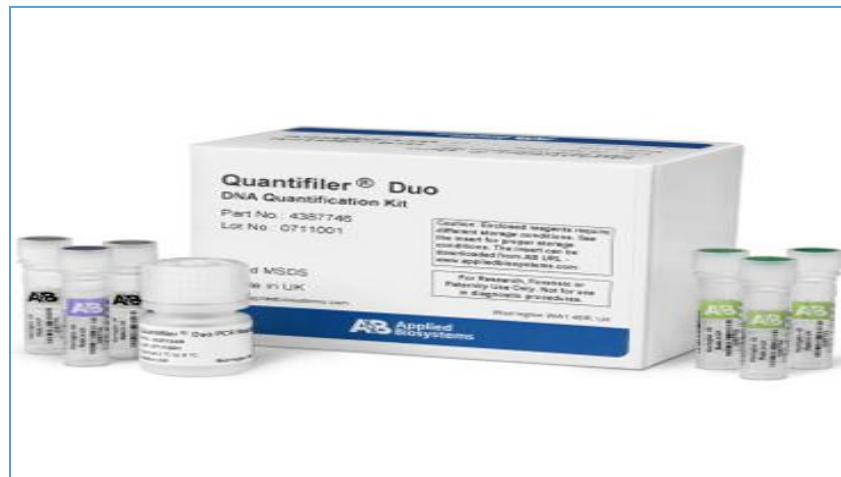


Imagen 10. Kit Quantifiler Duo DNA

## 11.- Justificación

Actualmente se producen circunstancias en las que aparecen restos humanos y/o cadáveres, que deben ser identificados y en los que es necesaria la exhumación de los restos óseos. Algunas situaciones cuando esto ocurre es en accidentes aéreos, catástrofes, guerras, fosas clandestinas, en algunos casos se han identificado personas en atentados terroristas como el ocurrido en Estados Unidos el 11- Sep.-2001, en España el atentado el 11-Marzo-2004 donde se logro la identificación a partir de restos óseos de victimas , o más recientemente el pasado 13 de mayo de 2014, donde una explosión en Turquía registro el peor accidente minero de la historia de este país, se reporta que más de 250 personas perdieron la vida, y la tarea de identificación no es nada sencilla. Sin embargo también se puede aplicar a casos civiles, en los cuales se necesita la comparación para poder establecer relaciones filiales y solo cuentan con restos óseos para el estudio.

En México no es la excepción, por ejemplo es recurrente encontrar encabezados de este tipo en los distintos periódicos y fuentes de información, El diario 20minutos en fecha 01-02-13 publica **“Se registra explosión en la Torre de Pemex; hay 25 muertos y decenas de heridos”**, en el diario por internet animalpolitico se muestra este título con fecha 21-08-14 **“México: cementerio de cuerpos y esperanzas para migrantes”**, en el diario zocalo-saltillo el 02-08-14 **“Hallan 4 cadáveres en narco fosas”**, y aun más recientemente en fecha 12-01-15 el diario.mx en internet publica un artículo con el sig. Encabezado **“En tres meses hallan 70 fosas con 89 cuerpos; ninguno de los normalistas”**, así como estos, muchos otros encabezados y noticias, debido a la gran ola de violencia que se vive en el país, por lo cual los cadáveres y restos humanos, se vuelve tarea difícil en materia de identificación, es por ello que se buscan nuevos métodos para dicho fin.

La identificación de cadáveres es de suma importancia por dos aspectos fundamentales. El primero es recuperar y examinar los restos con el fin de efectuar investigaciones criminológicas que permitan establecer la causa y la

manera del deceso; el segundo es identificar los restos y, si es posible, devolverlos a los familiares de la persona fallecida , Ya que las ideologías con respecto a la muerte son diferentes para cada cultura y con esto pueden dar un luto acuerdo a sus creencias sobre la muerte.

El proceso de identificación de los cadáveres requiere en todo caso de la actuación de equipos multidisciplinares procedentes de diferentes áreas científicas, como la antropología, la radiología, la odontología, la dactiloscopia o la Genética Forense, esto ayuda a la recuperación de cadáveres por parte de familiares o autoridades interesadas en distintos casos, tales como las circunstancias mencionadas con anterioridad (accidentes aéreos, catástrofes, guerras, fosas clandestinas, etc.)

Los restos óseos son en ocasiones la única fuente de ADN, ya que el hueso funciona como una barrera protectora del medio ambiente, en el caso de hueso la molécula de ADN queda comprimida entre los cristales de hidroxiapatita (fosfato de calcio), los cuales tienen afinidad por el ADN y lo estabiliza. Sin embargo en restos óseos se presentan diversas dificultades a la hora de obtención de perfiles genéticos, algunos de ellos son, la gran cantidad de muestras que se pueden encontrar en un sitio, se determinan además de la problemática anterior tres problemas que comprometen la obtención de perfiles genéticos de forma general en los laboratorios de Genética Forense: Cantidad de ADN, Calidad de ADN, Contaminantes del ADN.

Es por ello que se buscan nuevas metodologías que van desde el pre-tratamiento de la muestra pasando por extracción, purificación, hasta la obtención de perfiles genéticos, en donde aun no se resuelven con exactitud los problemas que se tienen al trabajar con restos óseos de condiciones no controladas, ya que cada evento es único e irrepetible.

Por lo anterior, en este estudio se someterá a evaluación, un método alternativo para la obtención de perfiles genéticos a partir de restos óseos, el método es ***“Desmineralización y Purificación mediante Silica en Columnas”***.

## 12.- Hipótesis

-El método “**Desmineralización y Purificación mediante Silica en Columnas**”, utiliza la descalcificación mediante EDTA en hueso molido liberando el total de ADN, se espera que la recuperación y purificación con este método genere mejor rendimiento con respecto a los métodos Automate Express y Fenol/Cloroformo, con esto permitiendo la obtención de perfiles genéticos. Así mismo el procedimiento de tamiz de ADN con columnas concentradoras de 100kDa permitirá la recuperación de ADN de calidad para prácticas forenses.

### 13.- Objetivos

-Objetivo general.

**\*Análisis del método “Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas”, en la obtención de perfiles genéticos a partir de restos óseos.**

-Objetivos particulares.

\*Extracción y purificación de ADN, a partir de restos óseos, utilizando los métodos Automate Express, Fenol/Cloroformo, Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas.

\*Cuantificación de ADN, mediante PCR Tiempo Real.

\*Amplificación ADN, mediante PCR Punto Final.

\*Análisis de fragmentos de los productos de PCR, por medio de electroforesis capilar (Obtención de perfiles genéticos).

\*Análisis y comparación de dos métodos Automate Express, Fenol/Cloroformo, con respecto al método Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas.



## 14.- Metodología

### Pre-tratamiento

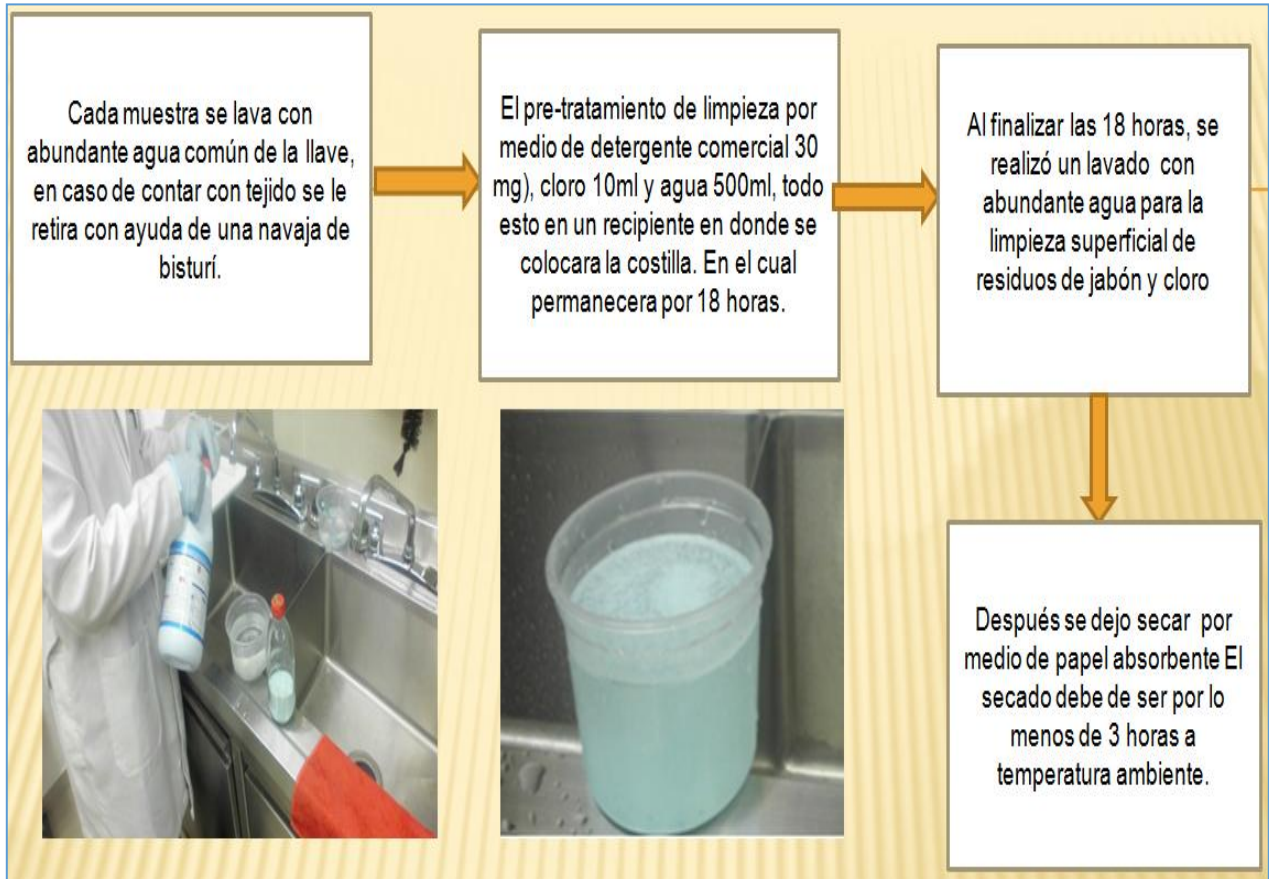
-Se tomaron 16 muestras de costillas, las cuales llegaron remitidas al INCIFO (Instituto de Ciencias Forenses), durante el periodo Agosto-October 2014, que tengan un peso mayor a 4grs, esto para dar oportunidad de repetir ensayos de ser necesario, y aun conservar muestra para análisis posteriores.

-Se les aplicó un pre-tratamiento el cual consiste en lavar las muestras con abundante agua común de la llave, en caso que aun tenga tejido se puede utilizar una navaja de bisturí para retirar el tejido. En general este paso es para quitar la mayor cantidad de contaminantes que estén presentes en la superficie de las muestras.

-Se llevó a cabo el pre-tratamiento de limpieza por medio de detergente comercial 30 mg (Maestro Limpio), cloro 10ml (Cloralex concentrado al 6%) y agua común (500ml), todo esto en un recipiente, después se colocó la costilla en el recipiente. En el cual permaneció por 18 horas.

-Al finalizar las 18 horas, se realizó a un lavado con abundante agua común para la limpieza superficial de residuos de jabón y cloro.

-Después se llevó a cabo el secado por medio de papel absorbente, para poder continuar con el procedimiento de extracción y purificación de ADN. El secado debe de ser por lo menos de 3 horas a temperatura ambiente. Y finalmente se resguardo en un sobre de papel amarillo, para su almacenamiento.



\*Este pre- tratamiento se le aplico a todas las muestras de costillas que se fueron utilizadas en el presente trabajo.

### Punto de Polvo

-Una vez seca la costilla, la muestra se debe llevar a punto de polvo, la muestra se desbastó frotándola contra una lima plana metálica bastarda 6 con mango (Truper®), y el polvo de hueso es recuperado en un vidrio de reloj. Este paso solo se realizó para los métodos Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas y Automate Express™.

-La cantidad fue de 50mg para ambos métodos (menos Fenol/Cloroformo), por lo cual se requirió una balanza analítica (Scientech™, EE. UU.) , para el pesado de polvo de hueso.

-Las muestras una vez pesadas, se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1.7ml (Axygen®, EE. UU).

\*De esta manera se obtuvo el polvo de hueso, se realizó para las costillas utilizadas en los métodos Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas y Automate Express™.



#### 14.1.- Método 1: Automate Express™ (Método Automatizado)

-Se Adiciono 230ul del PrepFiler BTA Lysis Solution a 50mg de polvo de hueso en un tubo de microcentrifuga de 1.7ul también 7ul de proteinasa K (Promega,10mg/ml) y 3ul de DL-Dithiothreitol (DTT) 1.0M (Amresco, Biochemicals and Life Science).

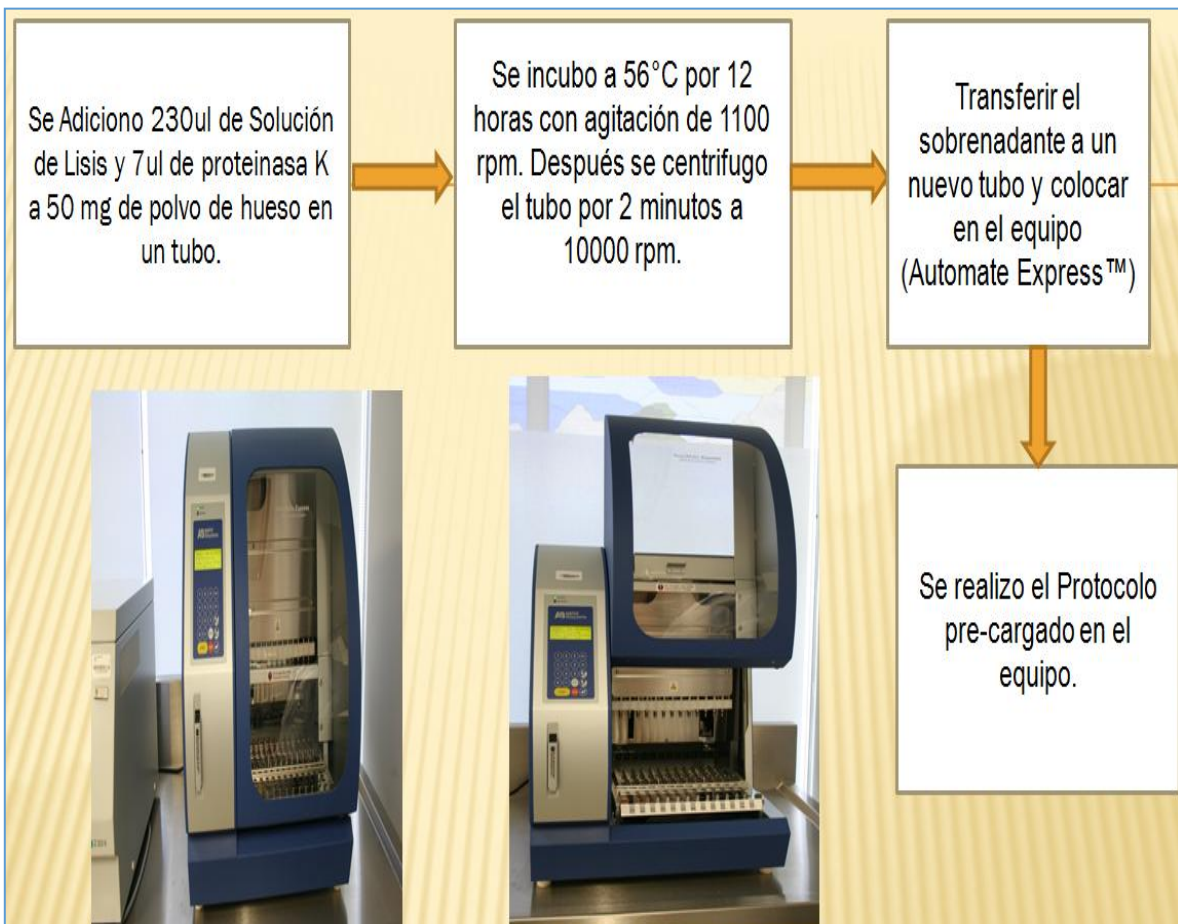
- Se incubo por 12 horas a 56°C con agitación contante a 1100rpm en el termoshaker (Labnet International, Inc.)

- Colocar el tubo en la centrifuga (Hermle Labortechnik) a 10000 rpm por 2 minutos.

-Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrifuga, colocar en el Instrumento Automate Express™ (Applied Biosystem).

-Programar el software del equipo (Scrip Prepfiler Express BTA Purification) y esperar aprox. 30 minutos a que el equipo haga la extracción y purificación.

\*Esto se realizó para cada muestra, al finalizar el paso 5, la muestra se almacenara a 4°C.



**\*Nota Todos los consumibles, reactivos son especiales y se encuentran en el kit de Automate Express™, El protocolo se realiza conforma a la guía de usuario, distribuido por Applied Biosystem.**

## 14.2.- Método 2: Fenol/Cloroformo

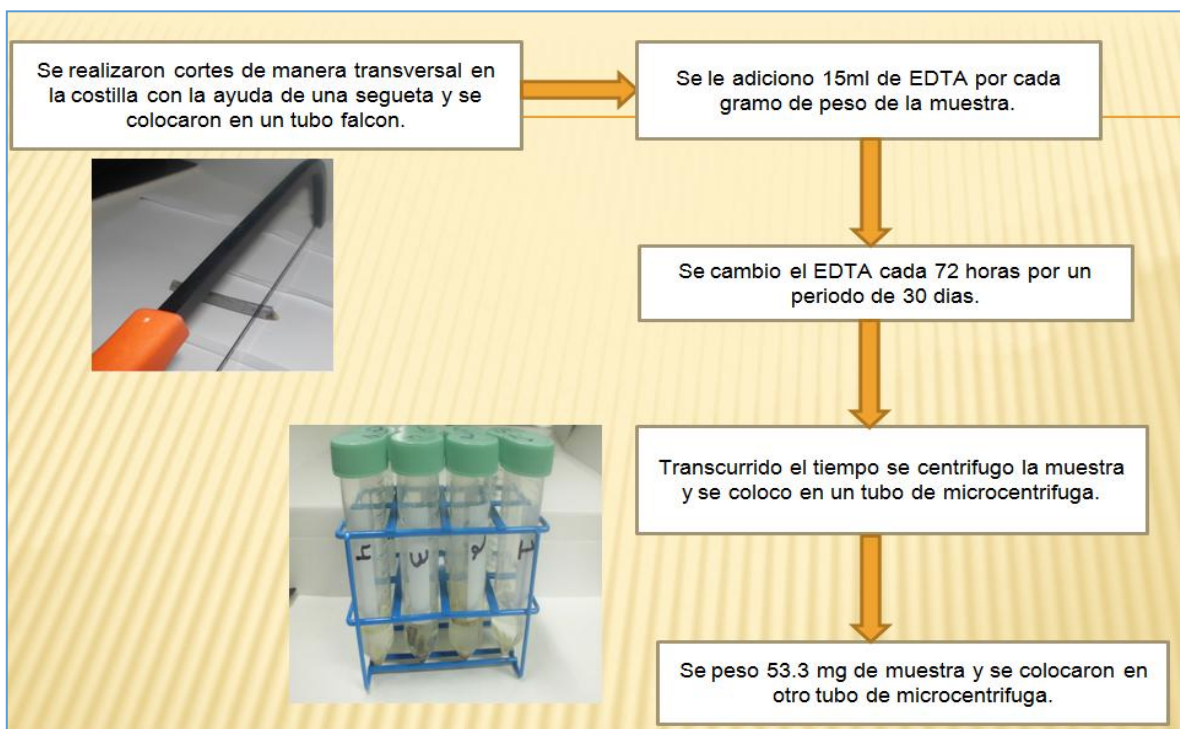
-Se ocupó la costilla limpia y seca, para realizar unos pequeños cortes (Aprox. 3mm de ancho) de manera transversal con la ayuda de una segueta (Truper®), y posterior se colocó en un tubo cónico falcón de 50ml (Zhejiang Gongdong Medical Technology Co. Ltd.).

-Se adicionó 15ml de EDTA pH 8, 0.5 M (Ambion® EE. UU.) por cada gramo de peso de la muestra en el tubo falcón.

-Se realizaron lavados de EDTA cada 72 horas, por 30 días. Esto con el fin de asegurar la descalcificación de la muestra.

-Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugo la muestra de hueso en una canastilla (Promega) por 3 minutos a 10,000 rpm, esto para deshacernos del exceso de líquido retenido en la muestra.

- Pesar 53.3 mg de muestra (Se pesaron 53.3 mg debido a que la retención de liquido era aprox. 6.6% en la muestra) se coloca en un tubo de microcentrifuga.



## Fenol/Cloroformo: Segunda Parte

-Se colocaron los 53.3 mg de hueso en un tubo de microcentrifuga de 1.7, y se adiciono 500ul de buffer de digestión , también 20ul de proteinasa k, dejar en el termoshaker por 12 horas, a 56°C a 10,000 rpm.

-Después transcurrido el tiempo, Agregar 5ul de DTT 1.0M, y colocar 1 hora más en el termoshaker, en mismas condiciones al paso 1.

-Posterior agregar 600ul de Fenol/Cloroformo (Amresco, Biochemicals and Life Science) a la muestra, dar vortex (Labnet International, Inc.) por 1 minuto. Luego centrifugar a 15,000 rpm temperatura ambiente por 10 minutos.

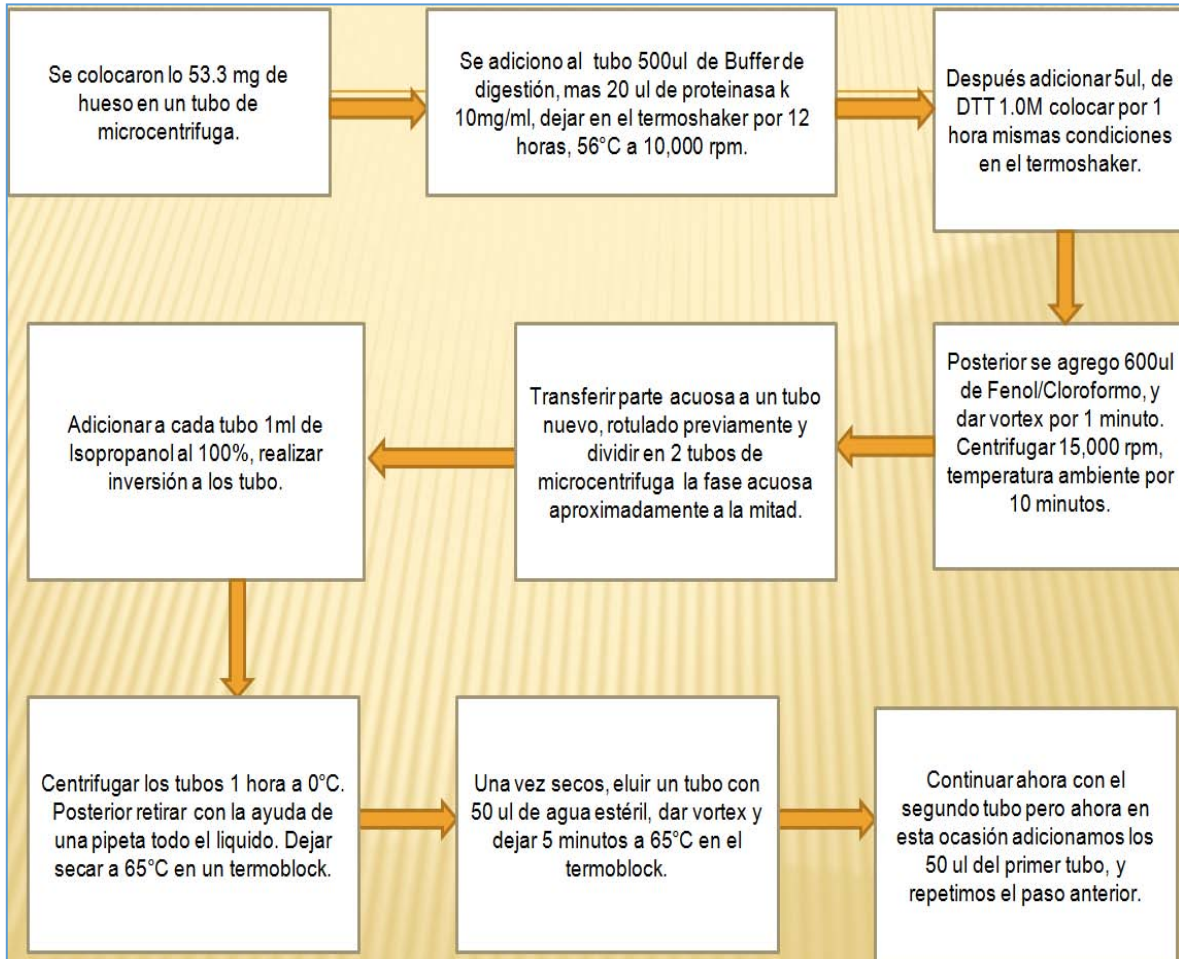
-Una vez pasados los 10 minutos, Transferir la parte acuosa a uno de los dos tubos nuevos de microcentrifuga, utilizando la mitad de la muestra para cada tubo.

-Adicionar a cada tubo de muestra 1ml de Isopropanol al 100% (REASOL<sup>®</sup>), mezclar por inversión.

-Centrifugar los tubos por 1 hora a 0°C. Posterior retirar todo el liquido. Dejar secar a 65°C en un termoblock.

-Una vez secos, eluir en un tubo con 50ul de agua estéril (Lab. Pisa), dar vortex y dejar 5 minutos a 65°C en el termoblock.

-Continuar ahora con el segundo tubo, pero en esta ocasión adicionar los 50ul que utilizamos para eluir en el primer tubo, y dejamos una vez más 5 minutos a 65°C en el termoblock.



\*Al finalizar se, almaceno la muestra a 4°C. Esta metodología se aplico a todas las muestras del método Fenol/Cloroformo.

### 14.3.- Método 3: Desmineralización, Purificación Mediante Silica en Columnas.

-Se ocuparon 50 mg de polvo de hueso, colocados en un tubo de microcentrifuga de 1.7ml .Se Adiciono al tubo 1ml de EDTA 0.5M, pH8 , y 10 ul de proteinasa k.

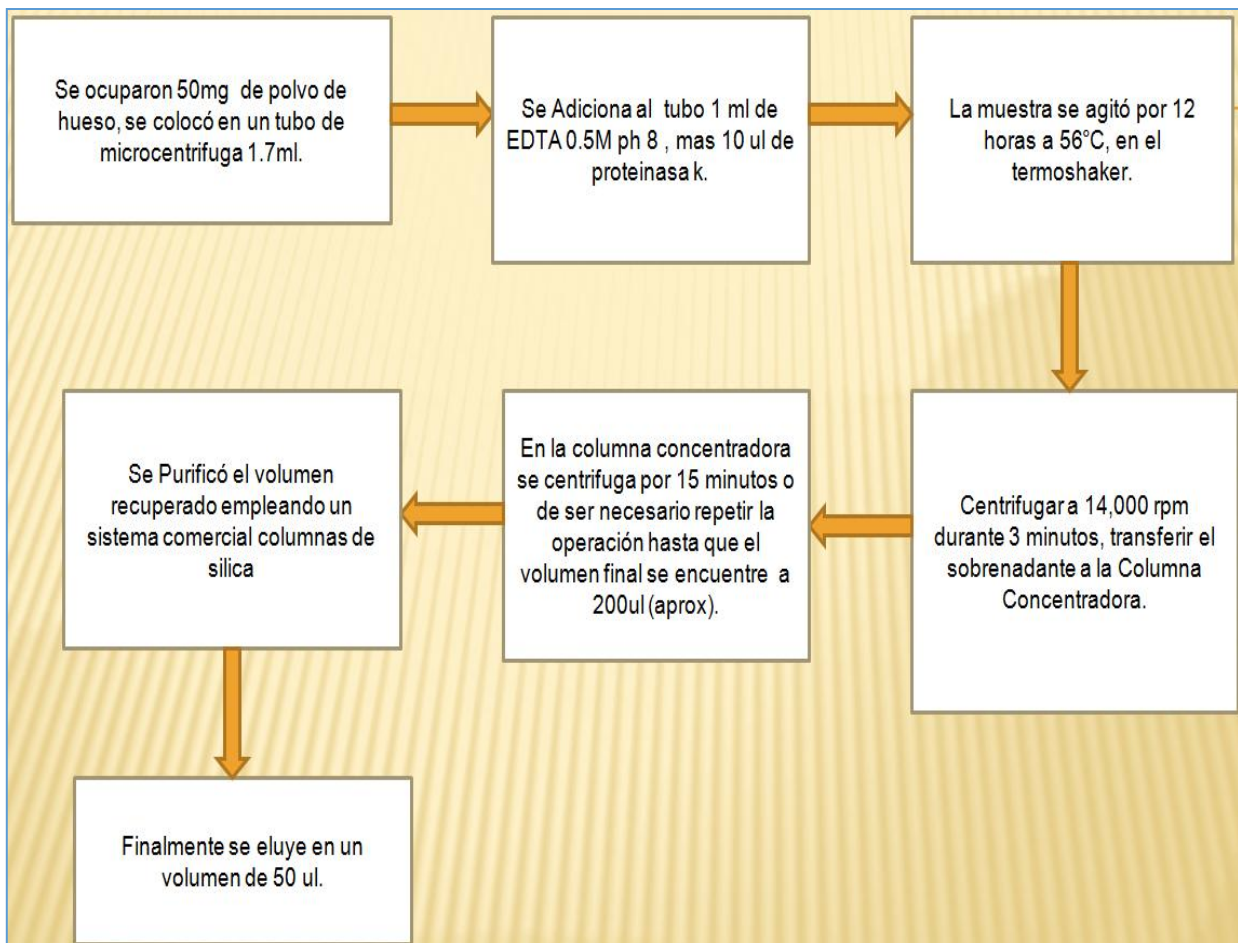
-La muestra se colocó en agitación por 10000 rpm, a 56°C en el termoshaker .

-Una vez pasado el tiempo, se centrifugo la muestra a 14000 rpm durante 3 minutos, posterior se transfirió el sobrenadante a la columna concentradora (Amicon<sup>R</sup> Ultra-0.5 100kda Mullipore).

-En la columna se centrifuga por 15 minutos en algunos casos fue necesario más tiempo, para lograr recuperar un volumen final de 200ul (aprox).

-Ya que se cuenta con el volumen deseado se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo, y se purificó el volumen recuperado empleando el sistema comercial de columnas de Silica (QIAquick, Qiagen) conforme al kit terminando en 50ul.

-Una vez realizado esta metodología, se almaceno a 4 °C la muestra.





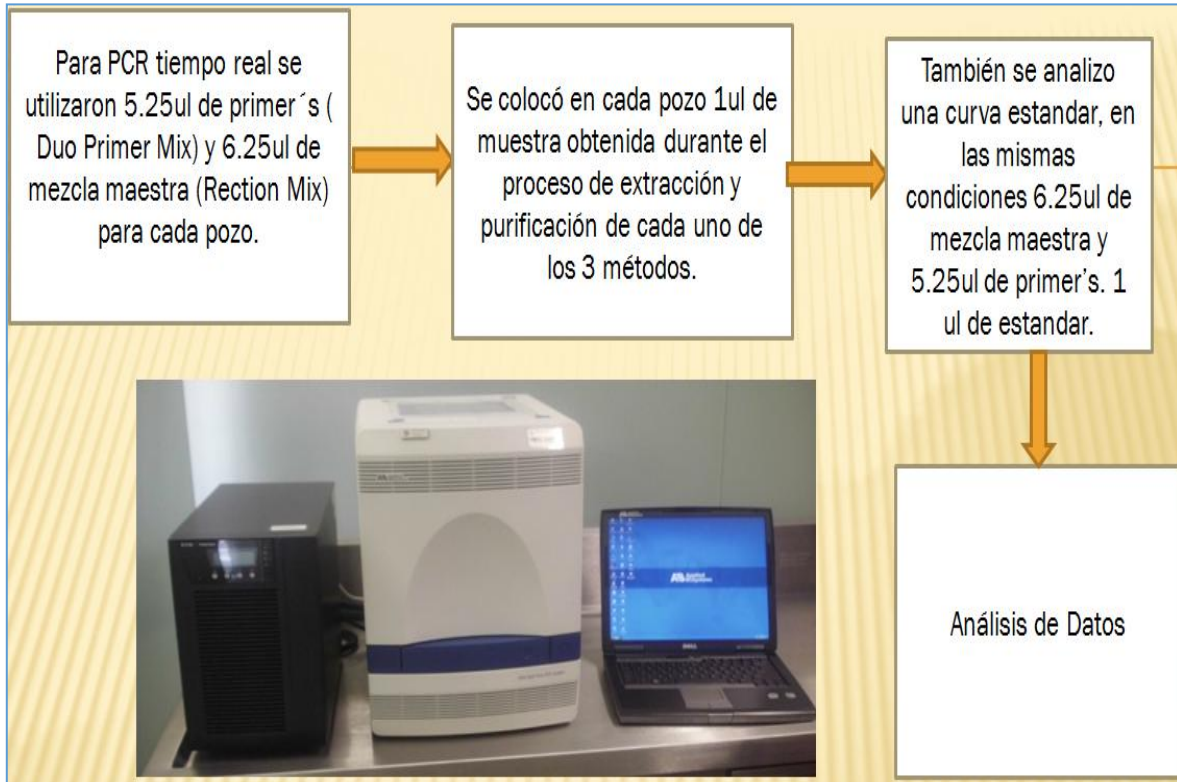
### **-PCR Tiempo Real (Cuantificación)**

El equipo utilizado fue un PCR Tiempo Real 7500, (Applied Biosystem).

- Se Inicia y se colocan en el software las condiciones de uso de acuerdo a al manual de usuario del equipo.
- Se Realizaron diluciones de una muestra de 200ng/ul de ADN, para la preparación de los estándares en las concentraciones:

Estándar 1 : 50ng/ul	Estándar 2: 16.7ng/ul	Estándar 3: 5.560ng/ul	Estándar 4 : 1.80ng/ul
Estándar 5: 0.62ng/ul	Estándar 6: 0.21ng/ul	Estándar 7: 0.068ng/ul	Estándar 8: 0.023ng/ul

- Se colocaron las muestras en los pozos de la placa de la sig. manera:
  - 5.25ul de primer's ( Duo Primer Mix) y 6.25ul de mezcla maestra (Rection Mix) para cada pozo.
  - A cada pozo se colocó 1ul de muestra obtenida durante el proceso de extracción y purificación de cada uno de los métodos Automate Express, Fenol/Cloroformo, Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas. Al igual que los estándares.
  - Análisis de datos e interpretación de los mismos.
- \*La cuantificación se realizó para todas las muestras en las mismas condiciones para cada uno de los métodos.



**Nota: El equipo se uso conforme a la guía de usuario del equipo Quantifiler Duo Kit, y los reactivos fueron distribuidos por Applied Biosystem 2012.**

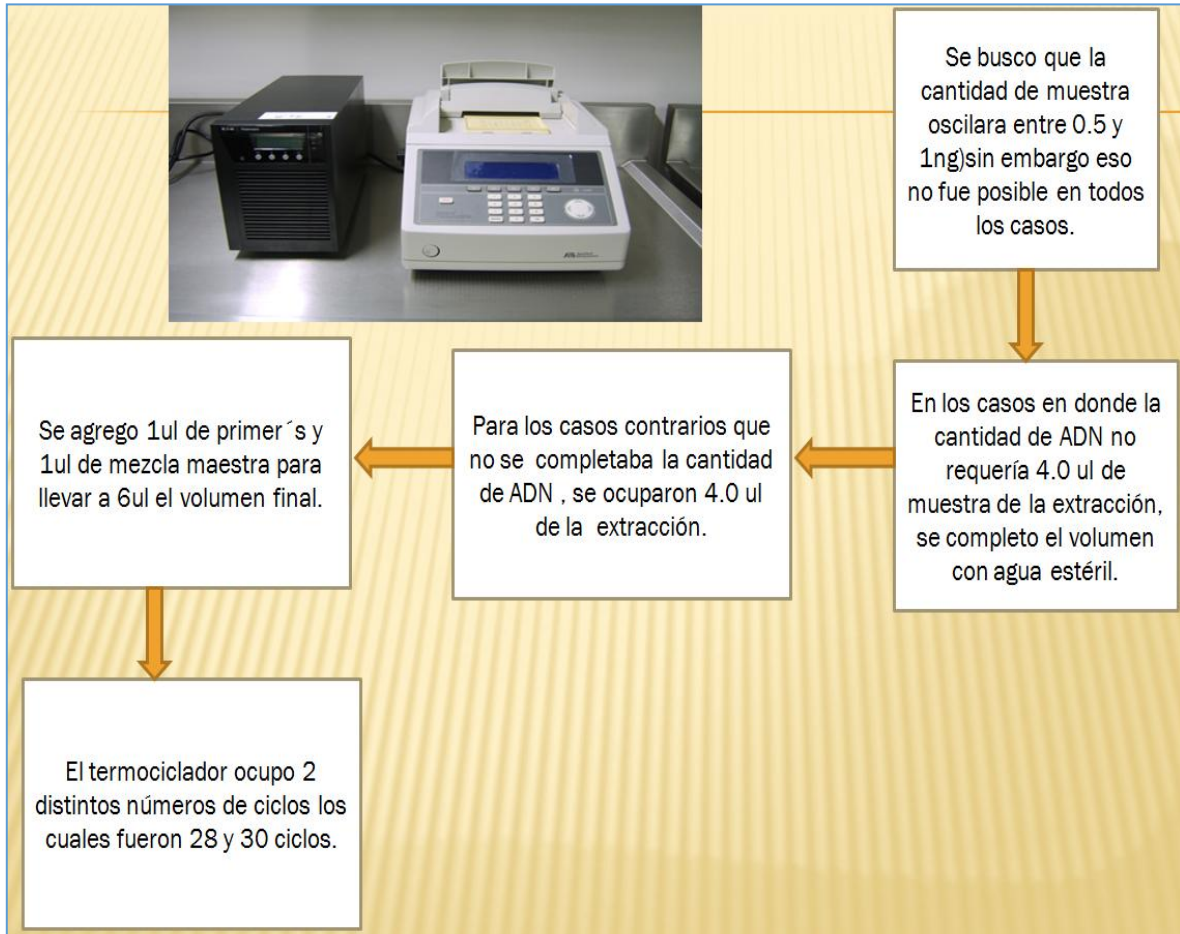
### **-PCR Punto Final (Amplificación)**

El equipo utilizado fue un termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystem)

-Para PCR punto final se ocupó una cantidad de ADN que oscilara entre 0.5ng y 1ng, para los casos que fuera posible, si se requería completar 4ul (cuando la cantidad de ADN requerido se encontraba en un volumen menor) estos fueron completados con agua estéril libre de nucleasas (Lab. Pisa), de caso contrario se ocupó la cantidad máxima posible en 4 ul de muestra.

-Se agrego 1ul de mezcla maestra y 1 ul de primer's al tubo de PCR (Axygen), para finalmente llevar la reacción a 6ul de volumen final.

-Se utilizaran dos números de ciclos los cuales serán 28 ciclos y el segundo 30 ciclos. Las rampas de temperatura y tiempo se utilizaron conforme al kit.



**Nota: Las condiciones del Termociclador fueron utilizadas conforme al proveedor y los reactivos fueron distribuidos por Promega.**

## **-Análisis de Fragmentos**

El equipo utilizado fue un secuenciador 3130 (Applied Biosystem)

- Colocar condiciones del software.

.-Se adicionó en cada pozo de la placa 12ul de formamida, 0.5ul de Cc5 estándar, y 0.5ul de muestra. También se tomó en cuenta una escalera alelica, en las mismas condiciones que las muestras.

-Análisis de fragmentos y obtención de perfiles genéticos.

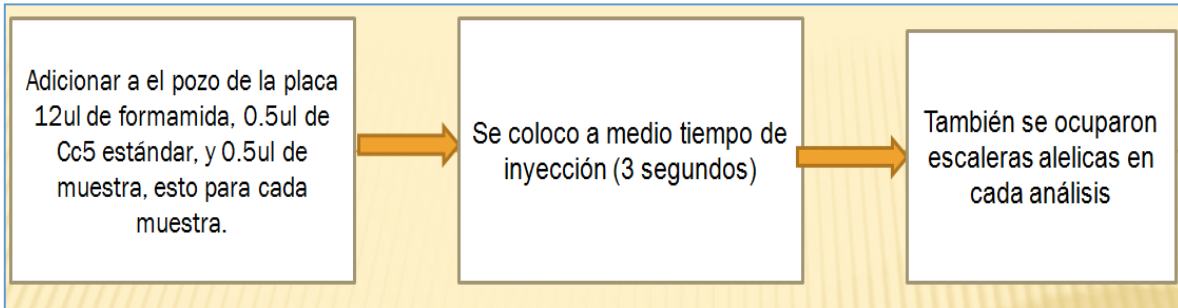


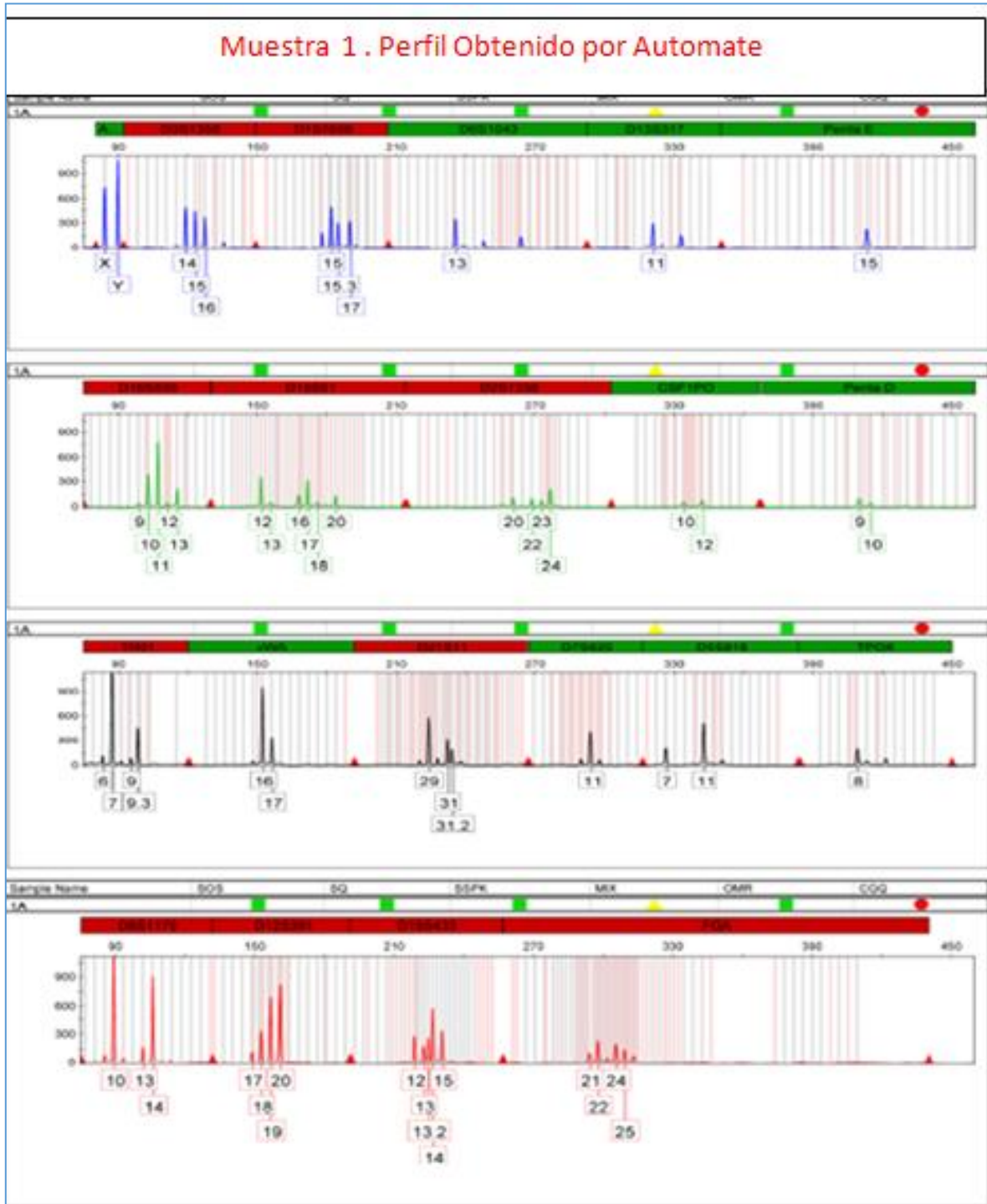
Imagen 12. Analizador Genético 3130, utilizado en el presente trabajo.

**Nota: Todos los consumibles utilizados de PowerPlex 21 distribuidos por Promega (2011).**

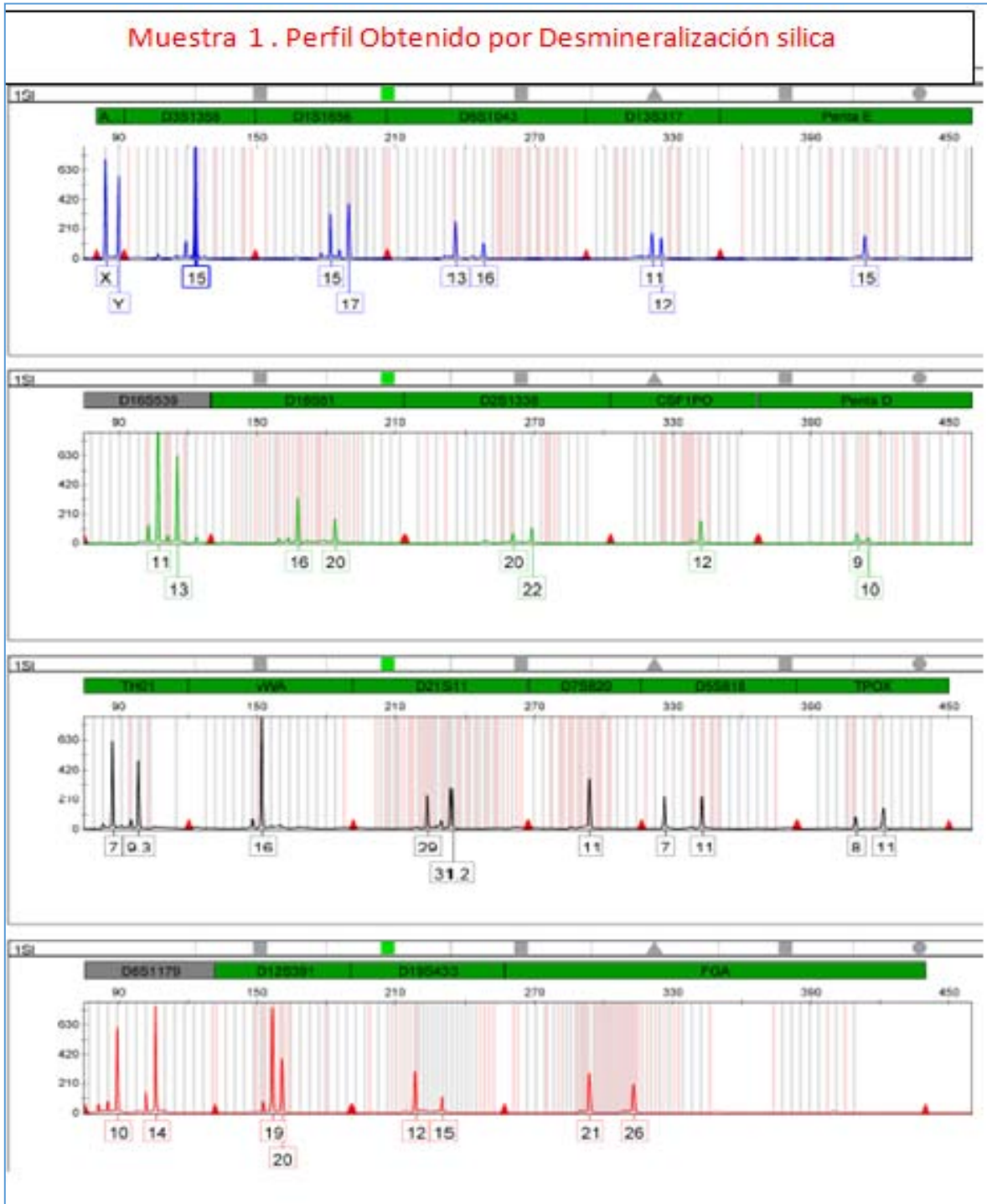
## 15.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos tanto de cuantificación así como de la obtención de perfiles genéticos se muestran en las siguientes tablas. De la misma manera se muestran los perfiles genéticos de cada muestra donde no se tuvo éxito para la identificación humana positiva (perfiles contaminados o parciales), comparando con los demás métodos.

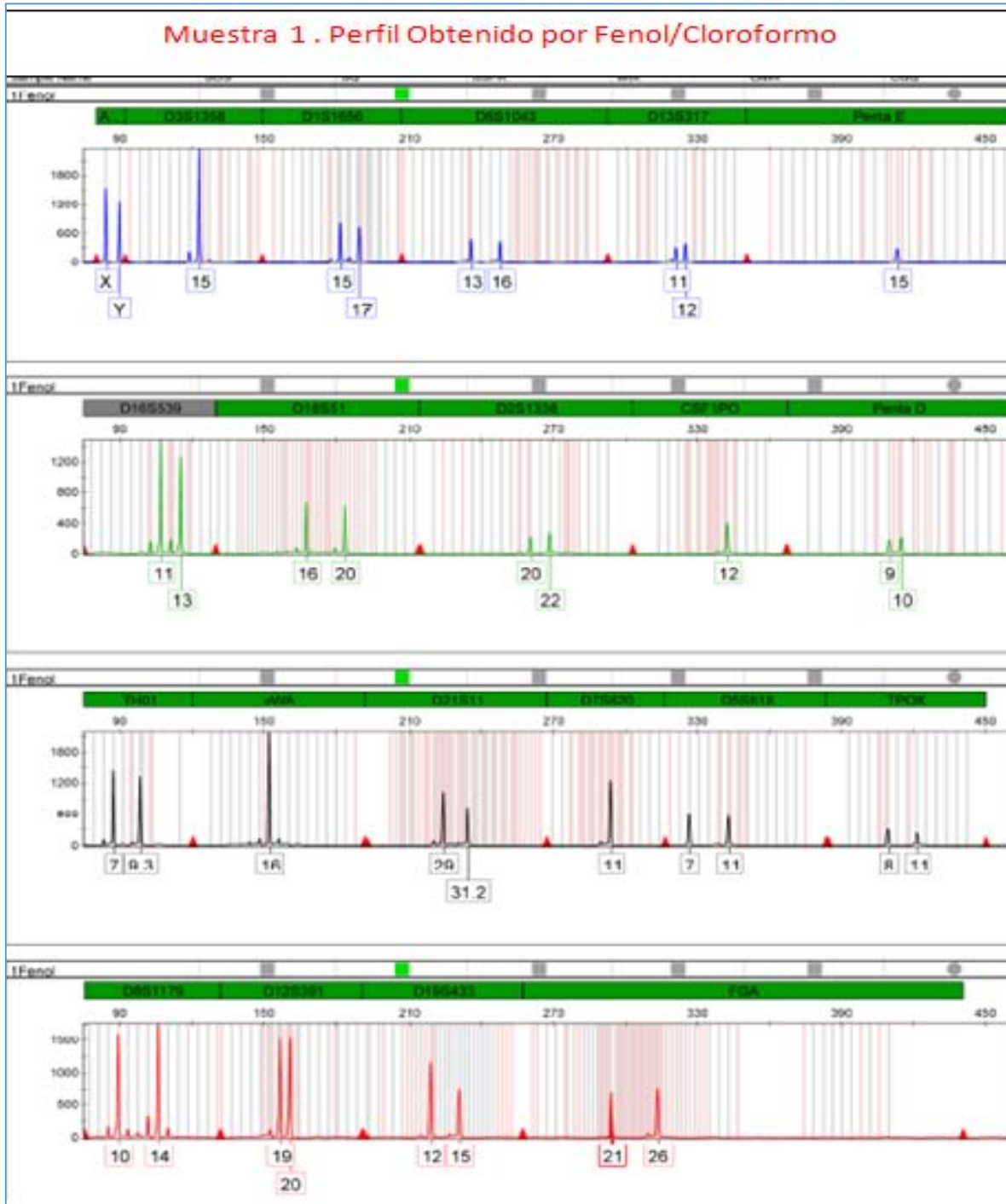
Muestra y Método	Cuantificación	Amplificación	Perfil Genético
1.-Automate.	0.0925 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Contaminado
1.-Desmineralización Silica.	0.032 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
1.-Fenol	0.164 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√



Perfil Genético. Muestra 1, obtenido por método Automate. Se muestra como el perfil está contaminado, se tiene más de 2 alelos por marcador indicados por el color rojo en el marcador. Perfil no exitoso para identificación humana.



Perfil Genético. Muestra 1, obtenido por Desmineralización Silica. Se observa claramente 2 alelos por marcador, sin embargo en los alelos se muestra una diferencia de tamaños que varía entre marcadores, esto por la degradación del ADN en la muestra. Perfil exitoso para identificación humana.

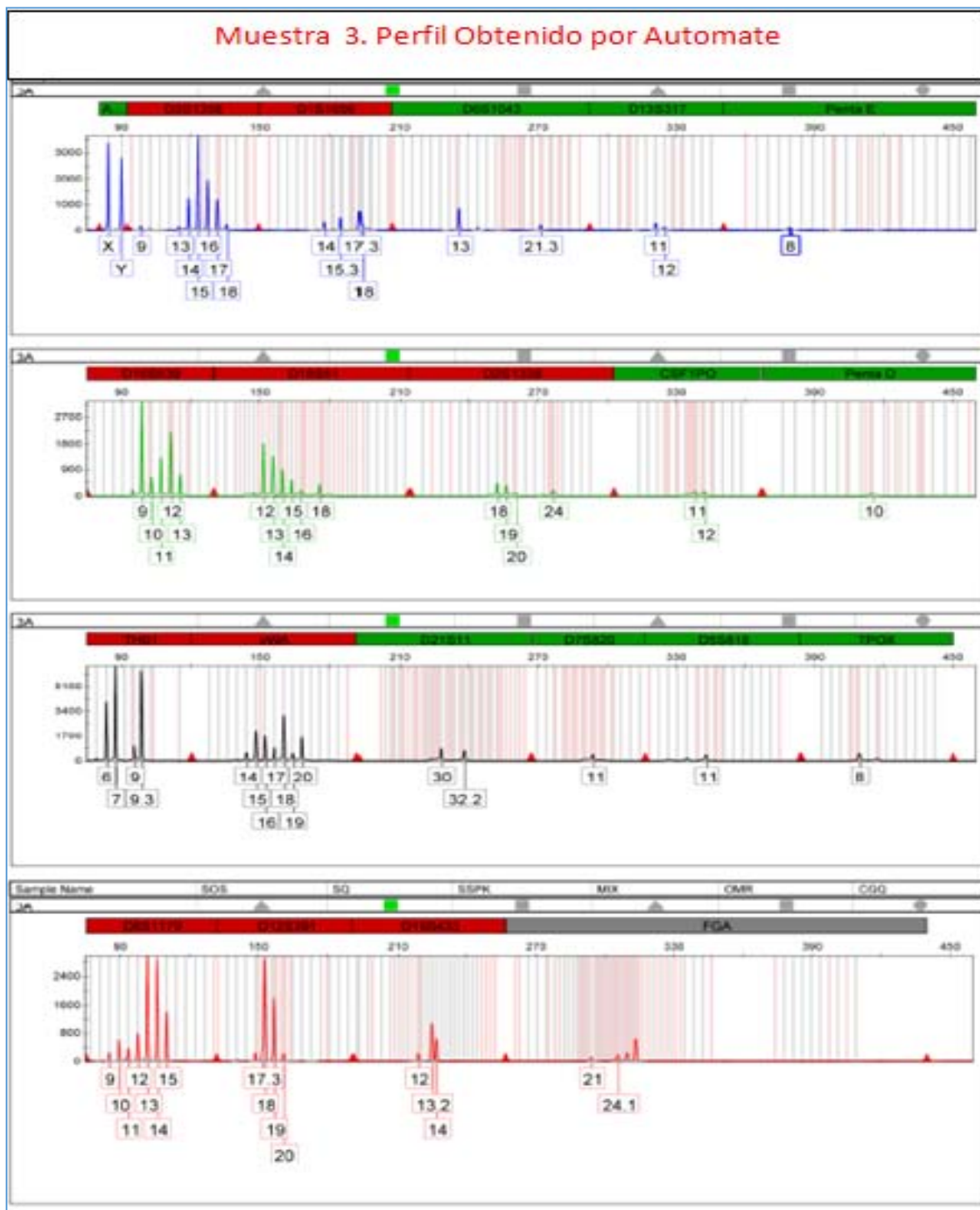


Perfil Genético. Muestra 1, obtenido por Fenol/Cloroformo. Se observa claramente 2 alelos por marcador, un perfil exitoso para identificación humana.

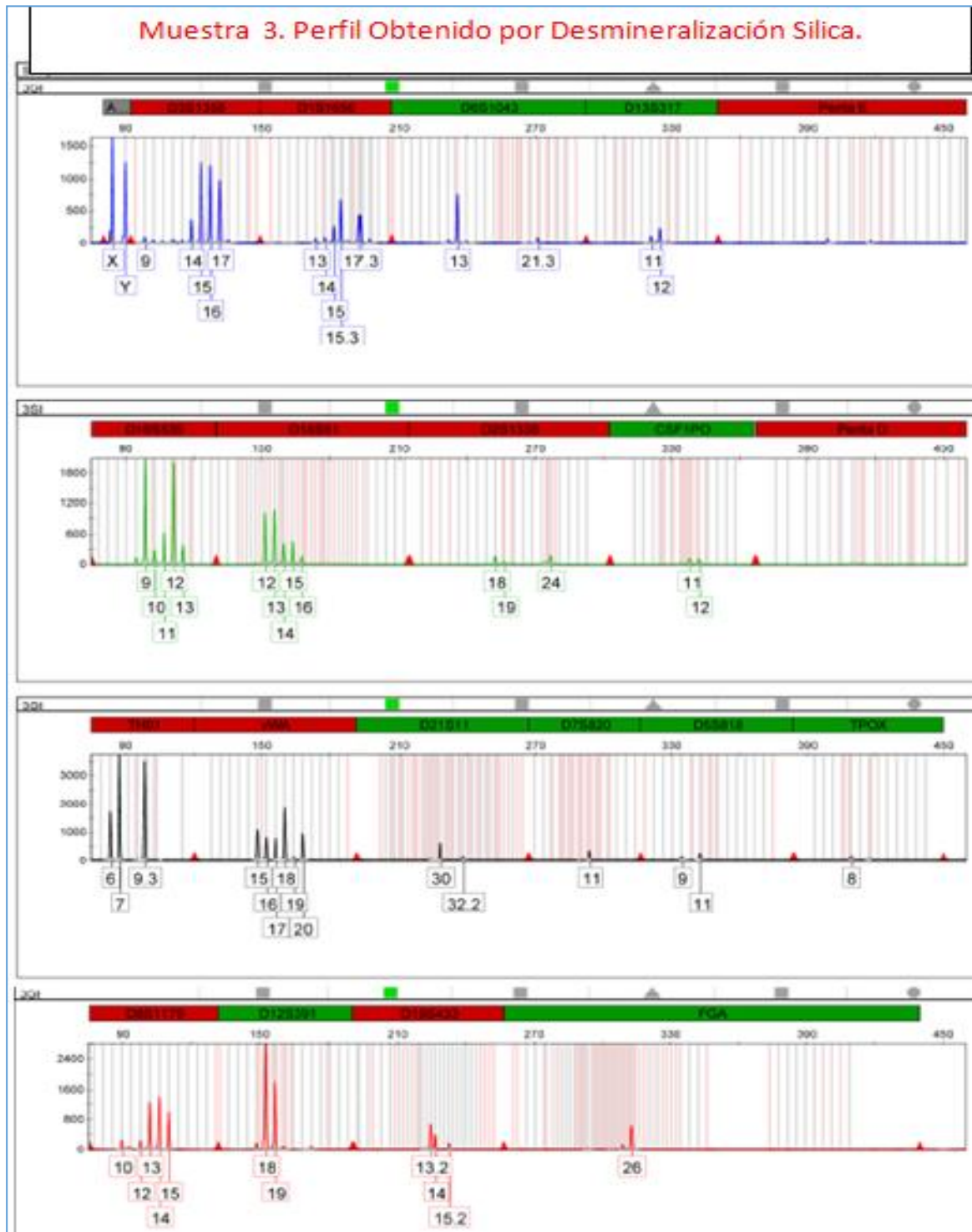


2.-Automate.	32.82 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
2.-Desmineralizacion Silica.	35.8 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
2.-Fenol	31.798 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√

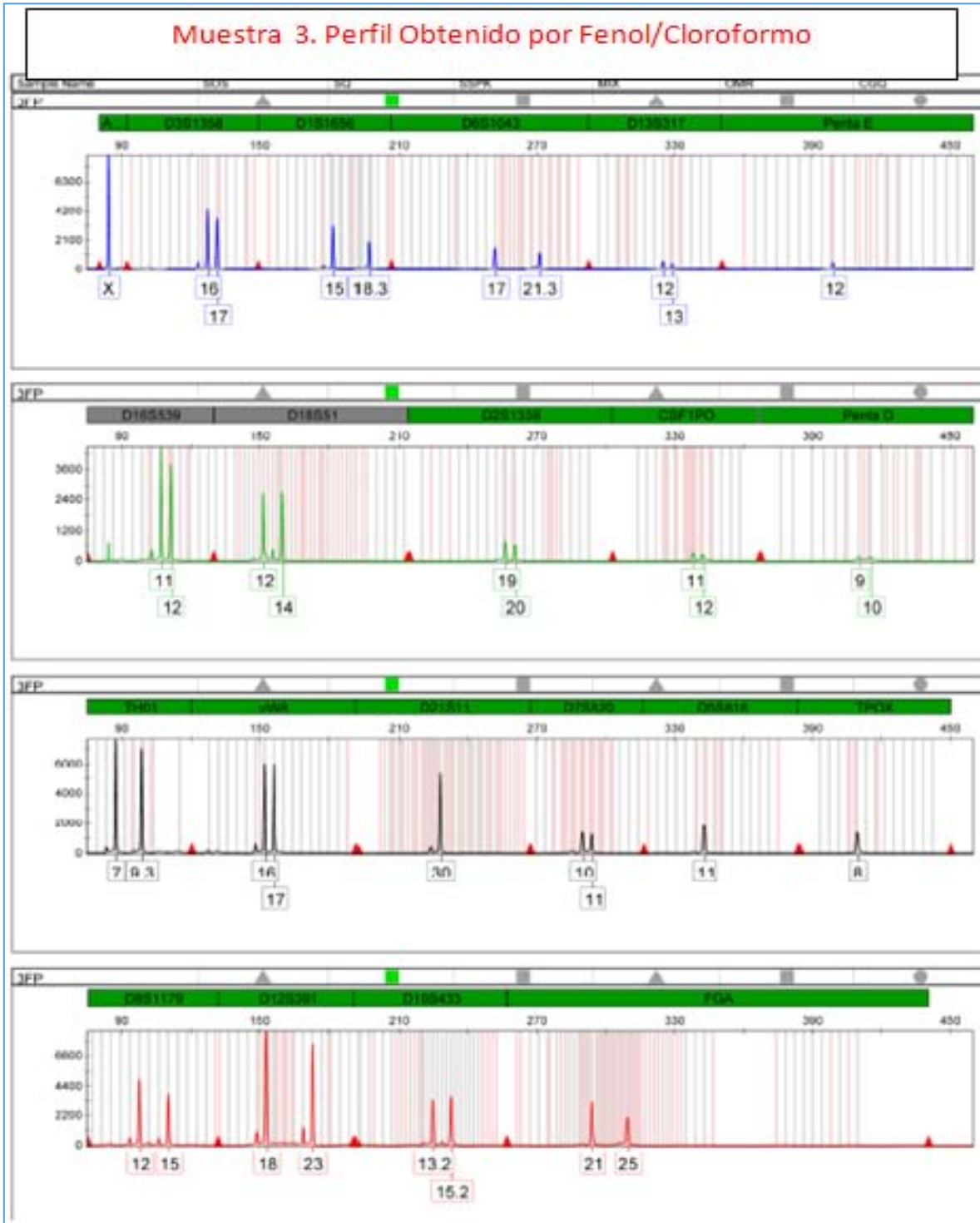
3.-Automate.	0.59 ng/ul	4ul muestra- 30ciclos	Parcial Contaminado
3.-Desmineralización Silica	0.09 ng/ul	4ul muestra-30ciclos	Parcial Contaminado
3.-Fenol/Co-Purificado	0.12 ng/ul	4ul muestra-30ciclos	√



Perfil Genético. Muestra 3, obtenido por Automate. Se muestra como el perfil está contaminado, se tiene más de 2 alelos por marcador indicados por el color rojo en el marcador. Perfil no exitoso para identificación humana.



Perfil Genético. Muestra 3, obtenido por Desmineralización Silica. Se observa claramente mas 2 alelos en algunos marcadores, cabe destacar que últimos marcadores no se logran observar (marcadores del lado izquierdo de la imagen). Perfil no exitoso para identificación humana.



Perfil Genético. Muestra 3, obtenido por Fenol/Cloroformo. Se observa claramente 2 alelos por marcador, además se observan todos los marcadores es decir esta completo. Perfil exitoso para identificación humana.

4.-Automate.	0.894 ng/ul	1ul muestra- 28ciclos	√
4.- Desmineralización Silica.	0.306 ng/ul	3ul muestra-28ciclos	√
4.-Fenol	0.7141 ng7ul	1ul muestra-28ciclos	√

5.-Automate.	20.89 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
5.- Desmineralización Silica.	4.705 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
5.-Fenol	4.59 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√

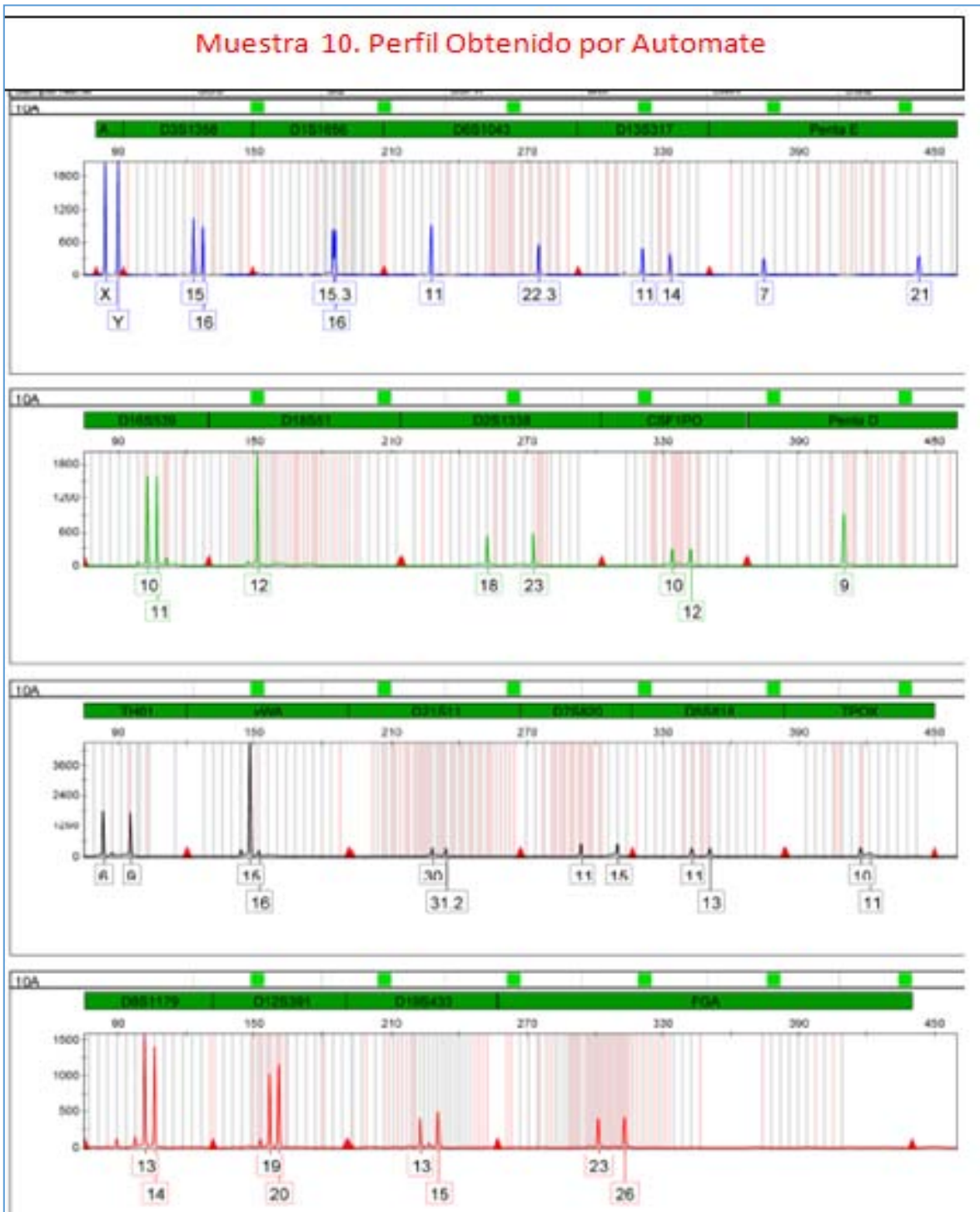
6.-Automate.	0.442 ng/ul	2ul muestra-28ciclos	√
6.-Desmineralización Silica	0.206 ng/ul	4ul muestra-28 ciclos	√
6.-Fenol	2.786 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√

7.-Automate.	53.34 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
7.- Desmineralización Silica.	63.31ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
7.-Fenol	37.73 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√

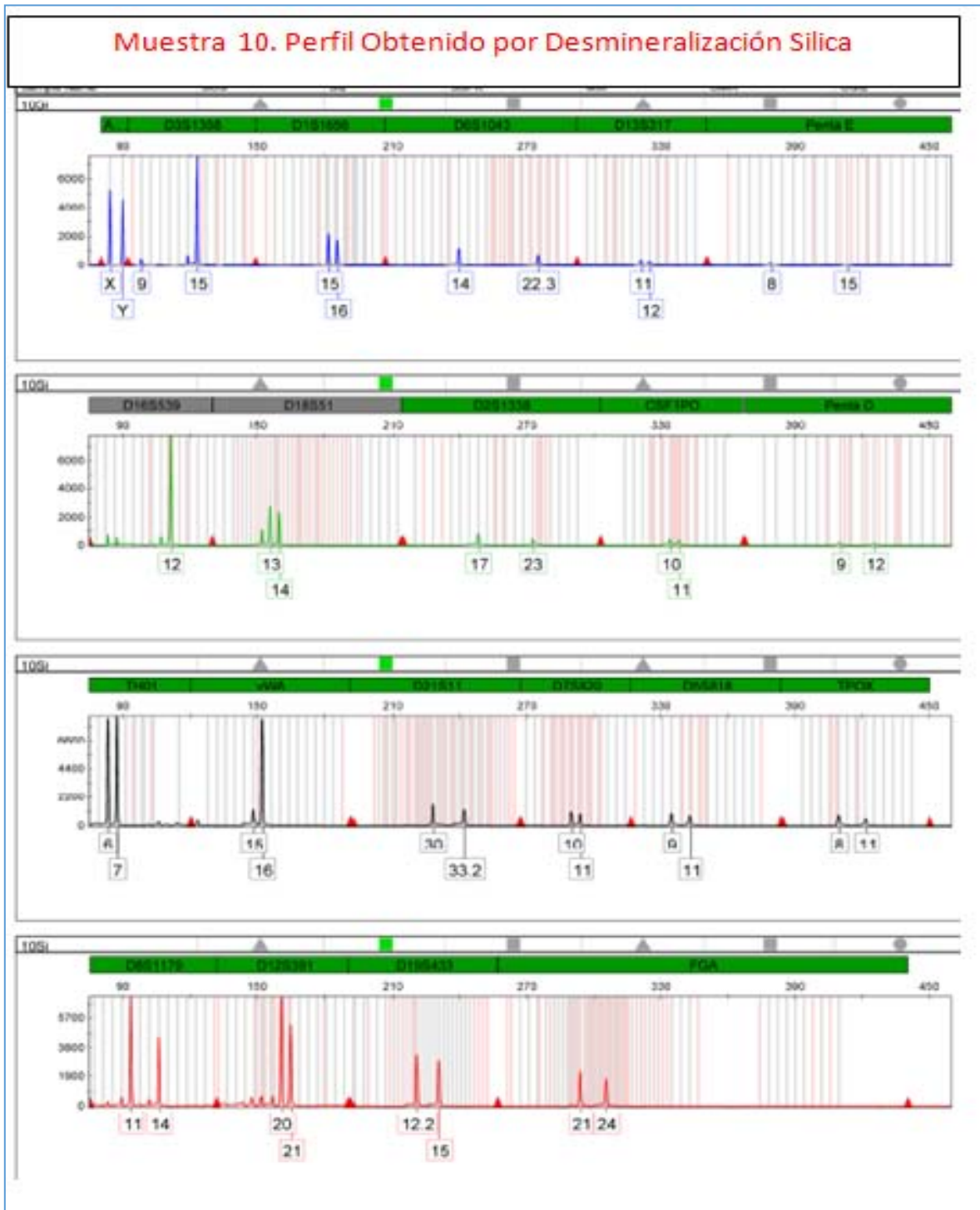
8.-Automate.	1.19 ng/ul	1ul muestra-28 ciclos	√
8.- Desmineralización Silica.	0.633 ng/ul	2ul muestra-28 ciclos	√
8.-Fenol	1.16ng/ul	1ul muestra- 28 ciclos	√

9.-Automate.	214.25 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
9.- Desmineralización Silica	2259.15 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√
9.-Fenol / Co-Purificado	192.2909 ng/ul	1ul muestra (dilución 1ng/ ul) 28 ciclos.	√

10.-Automate.	1.2135 ng/ul	1ul muestra-28 ciclos	√
10.- Desmineralización Silica.	0.1835 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
10.-Fenol /Co-Purificado	1.0642 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Parcial contaminado

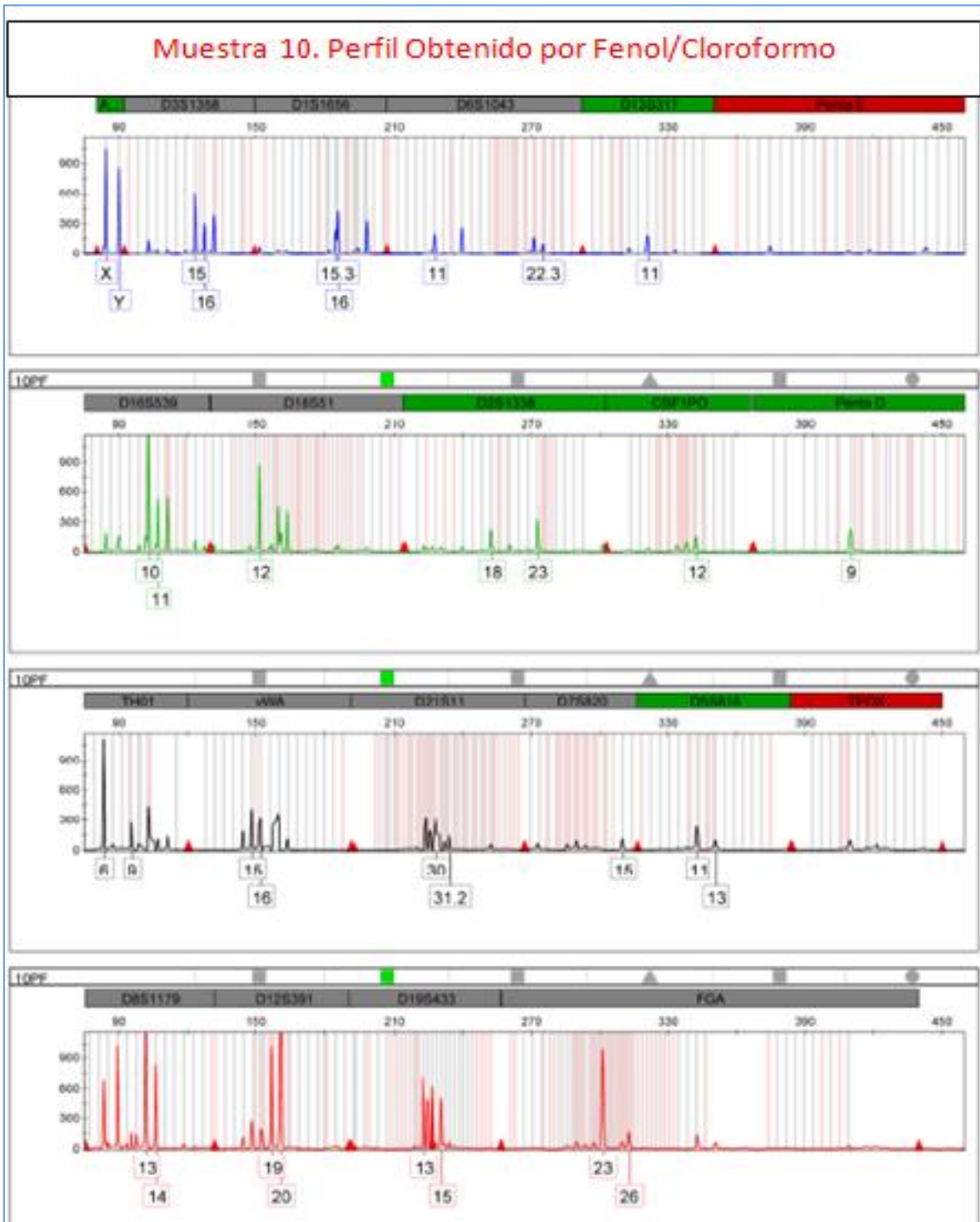


Perfil Genético. Muestra 10, obtenido por Automate. Se observa 2 alelos por marcador. Perfil exitoso para identificación humana.



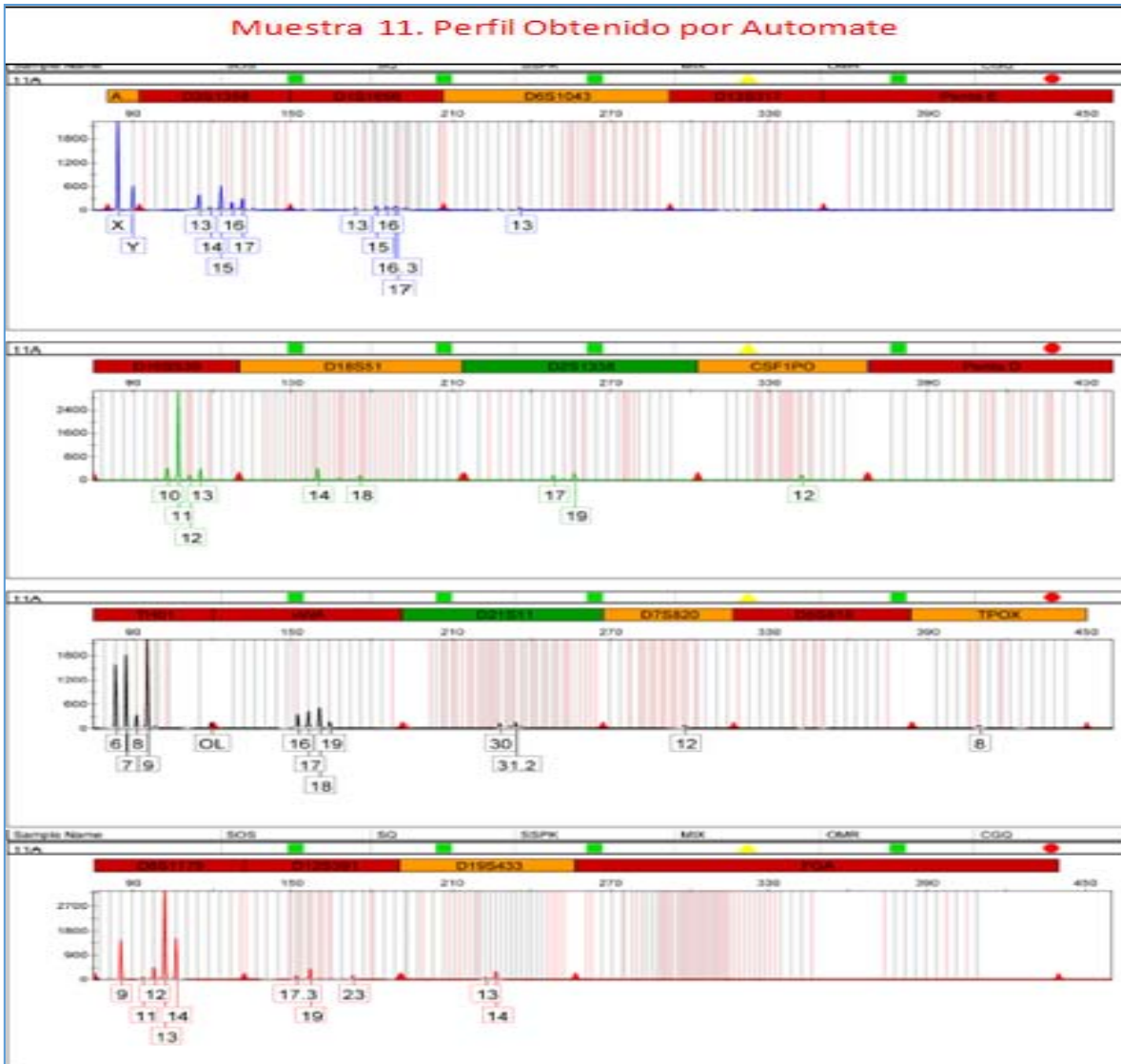
Perfil Genético. Muestra 10, obtenido por Desmineralización Silica. Se observa 2 alelos por marcador. Perfil exitoso para identificación humana.



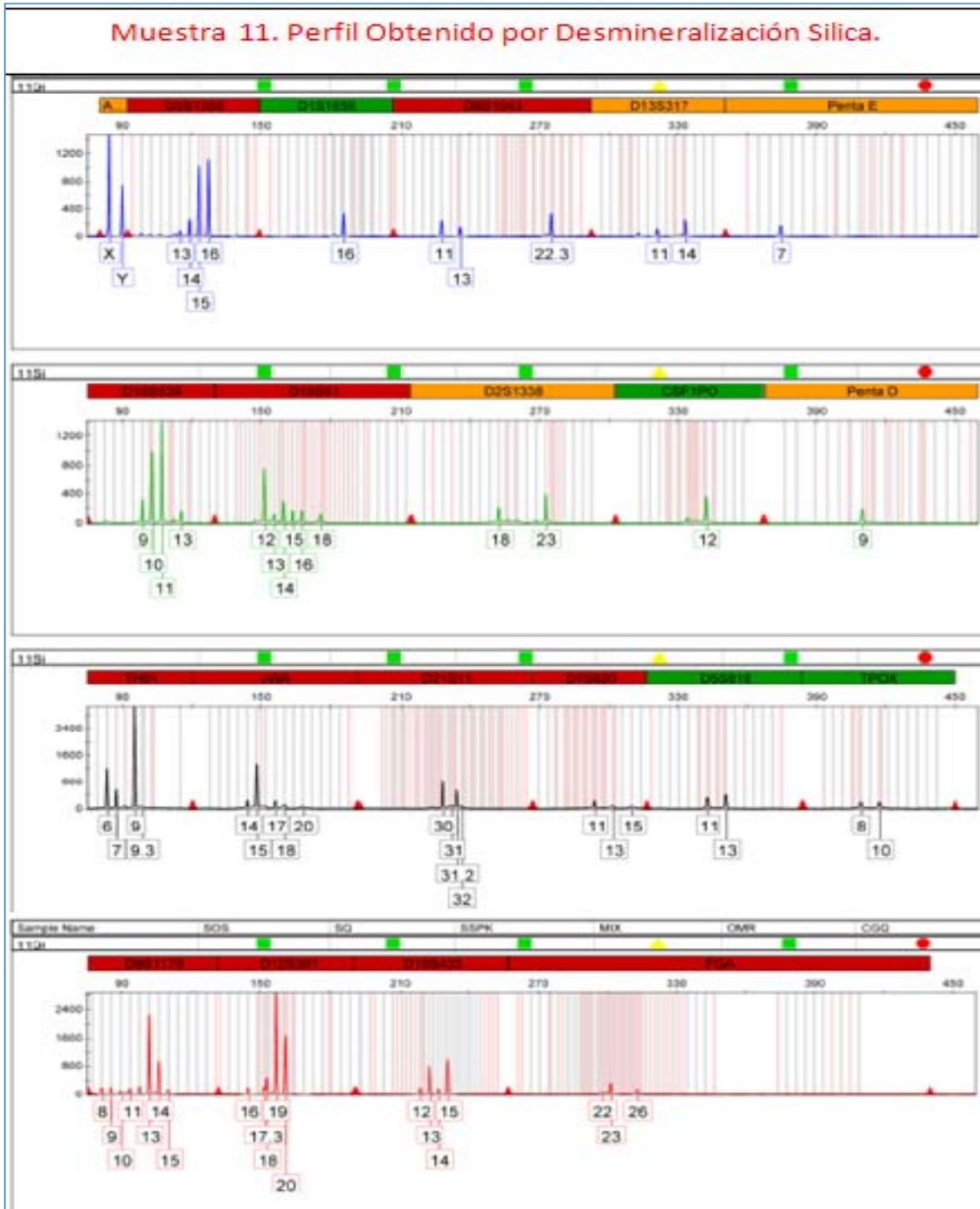


Perfil Genético. Muestra 10, obtenido por Fenol/Cloroformo. Perfil no exitoso para identificación humana.

11.-Automate.	0.1370 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Parcial Contaminado
11.- Desmineralización Silica.	0.066 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Parcial Contaminado
11.-Fenol/Co-Purificado	0.0606 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Parcial Contaminado

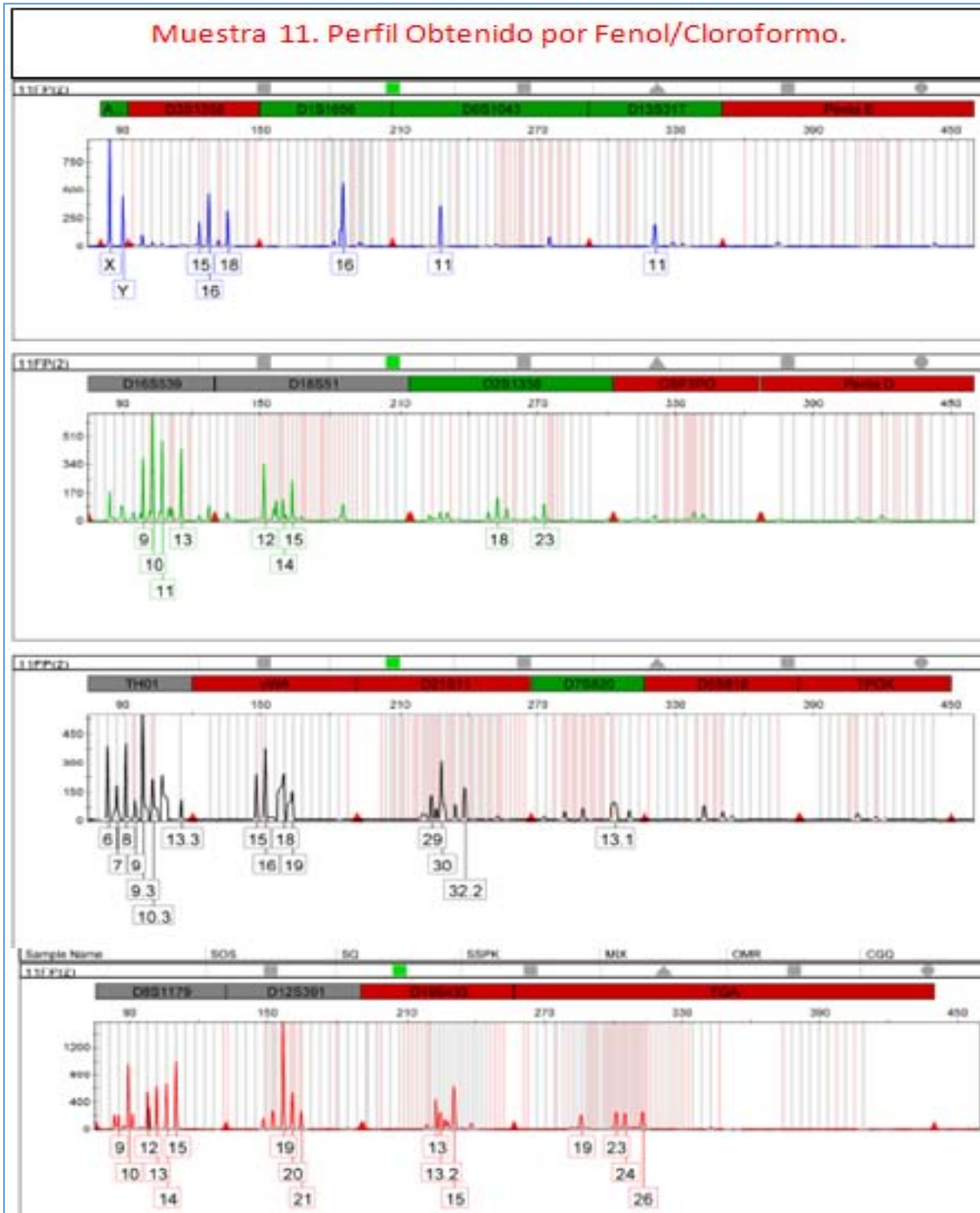


Perfil Genético. Muestra 11, obtenido por Automate. Se observa más de 2 alelos por marcador es decir contaminado, además los últimos marcadores (lado izquierdo de la imagen)no se observan. Perfil no exitoso para identificación humana.



Perfil Genético. Muestra 11, obtenido por Desmineralización Silica. Se observa más de 2 alelos por marcador es decir contaminado, y se alcanzan a apreciar los marcadores más grandes (lado izquierdo de la imagen). Perfil no exitoso para identificación humana.

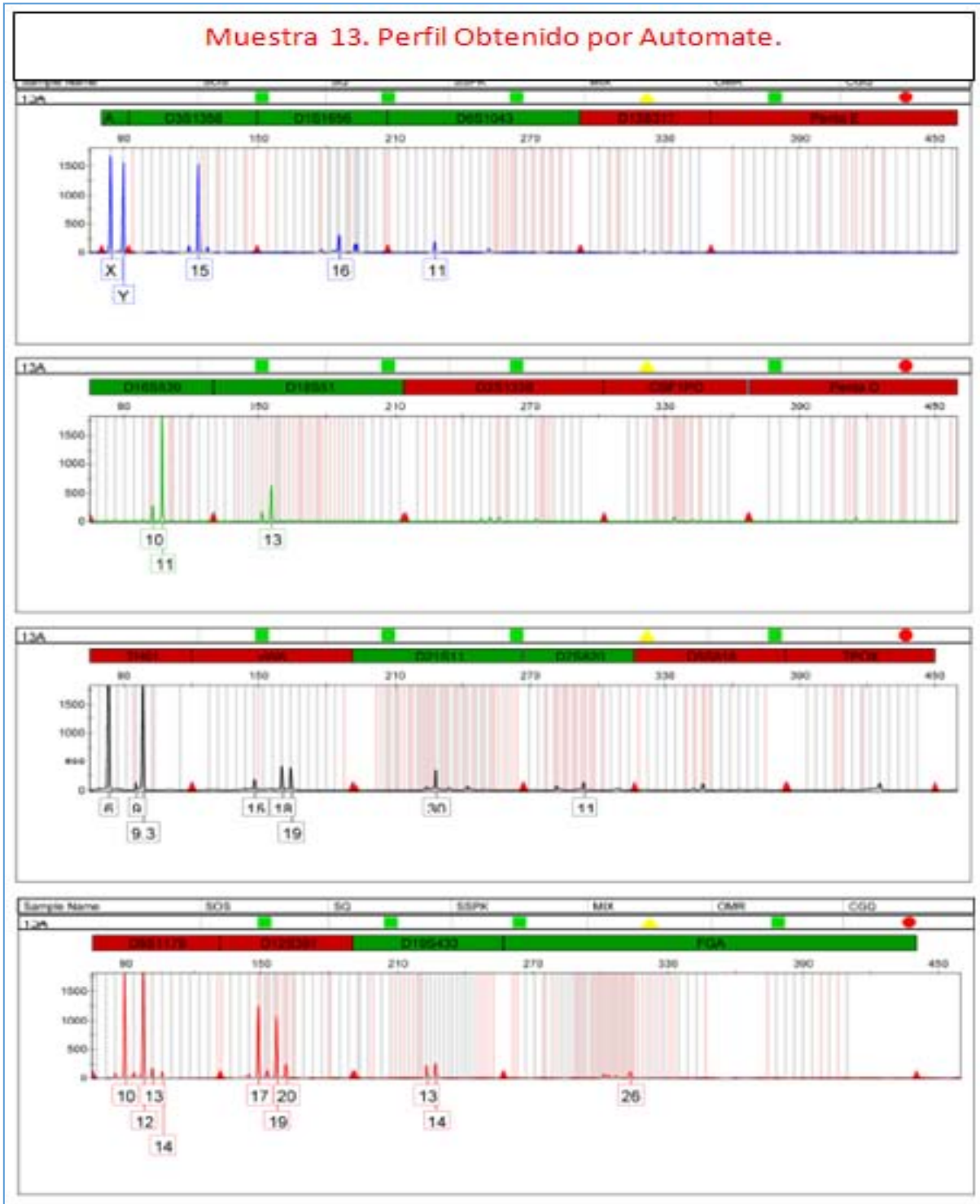




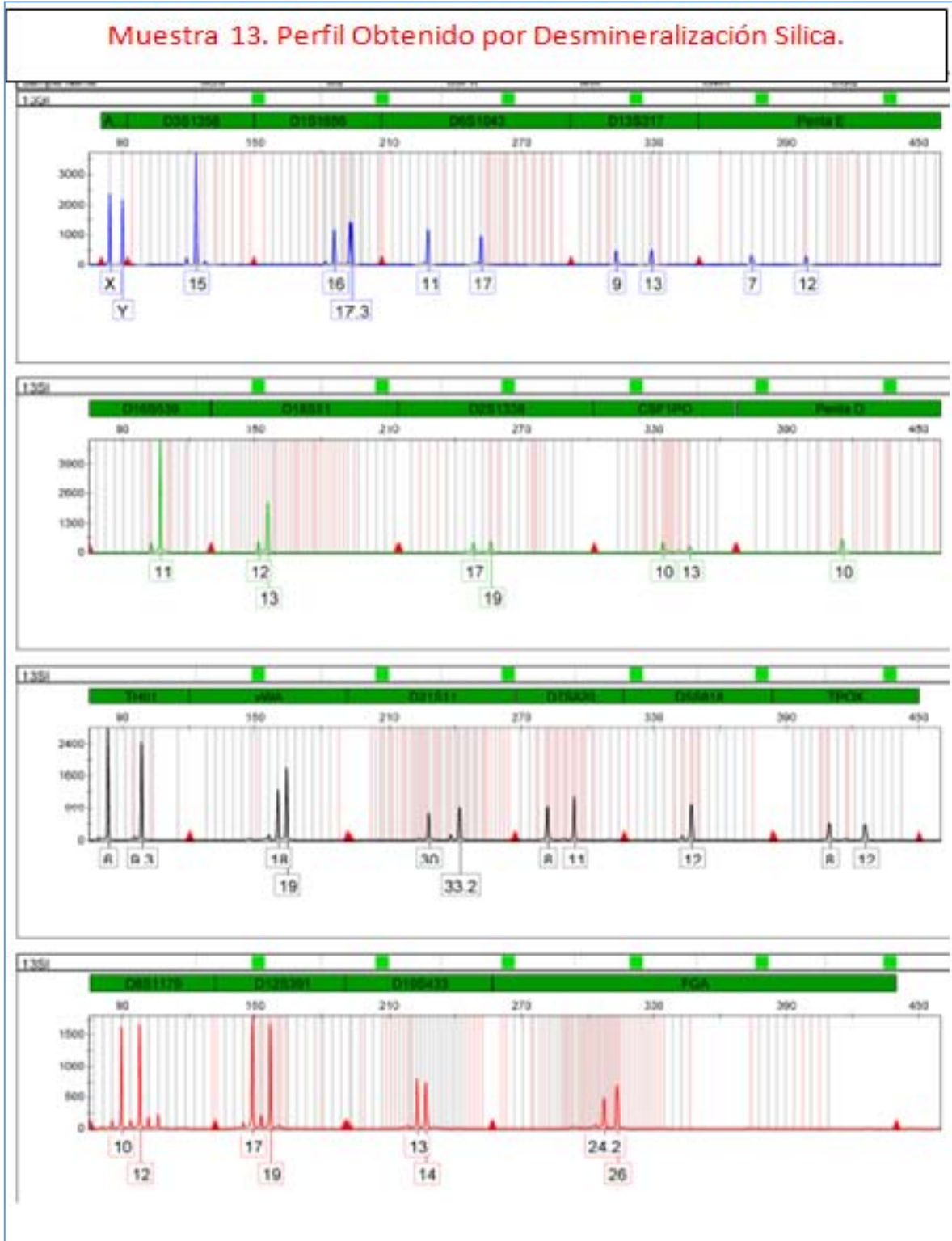
Perfil Genético. Muestra 11, obtenido por Fenol/Cloroformo. Se observa más de 2 alelos por marcador es decir contaminado, y no se observan los alelos de los últimos marcadores (lado izquierdo de la imagen). Perfil no exitoso para identificación humana.

12.-Automate.	0.1039 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
12.- Desmineralización Silica.	0.312 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
12.-Fenol	0.1378 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√

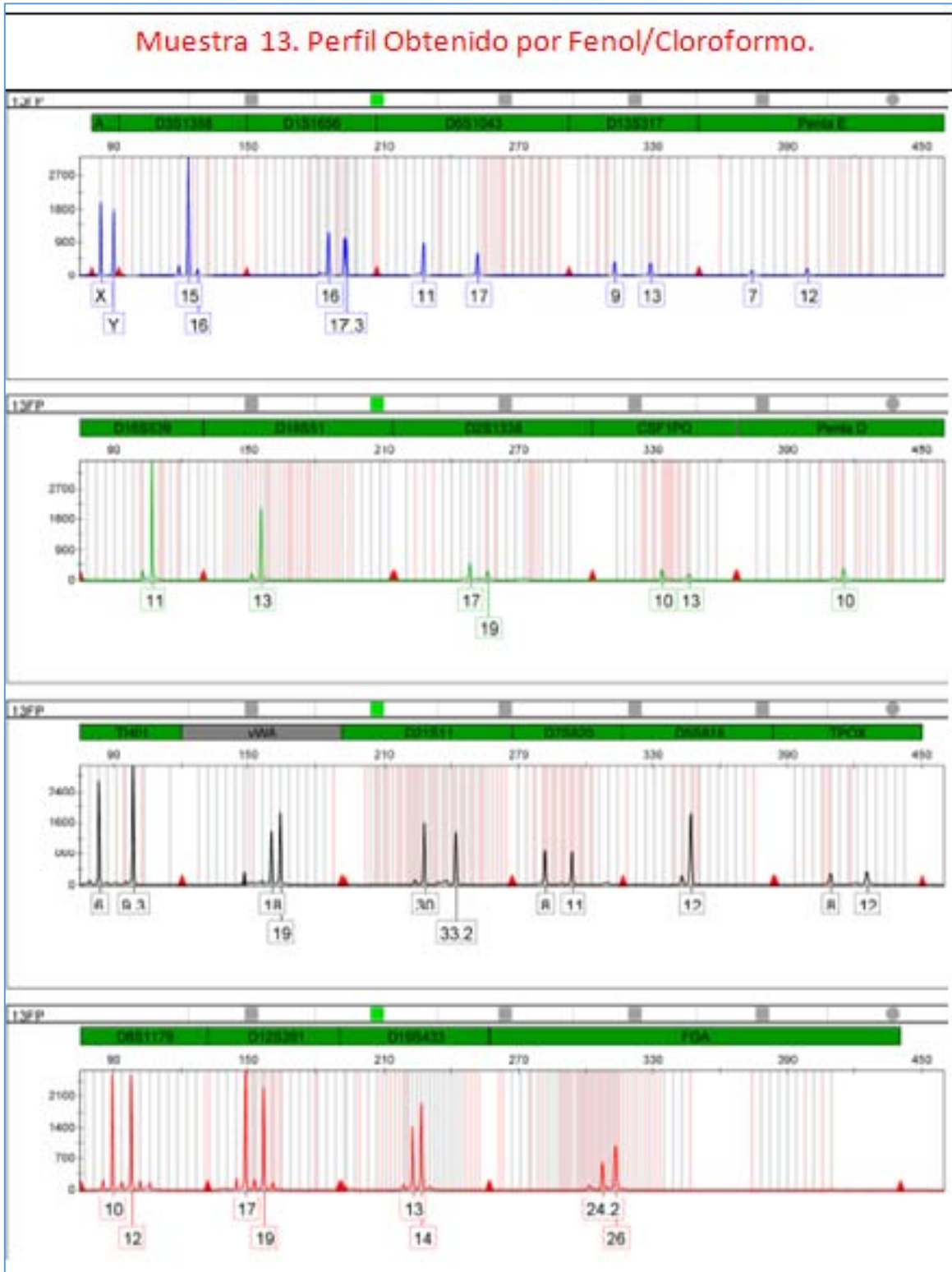
13.-Automate.	0.01738 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Parcial Contaminado
13.- Desmineralización Silica.	0.04513 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
13.-Fenol/ Co-Purificado	0.0228 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√



Perfil Genético. Muestra 13, obtenido por Automate. Se observa más de 2 alelos por marcador es decir contaminado, además los últimos marcadores (lado izquierdo de la imagen) no se observan. Perfil no exitoso para identificación humana.



Perfil Genético. Muestra 13, obtenido por Desmineralización Silica. Perfil exitoso para identificación humana.



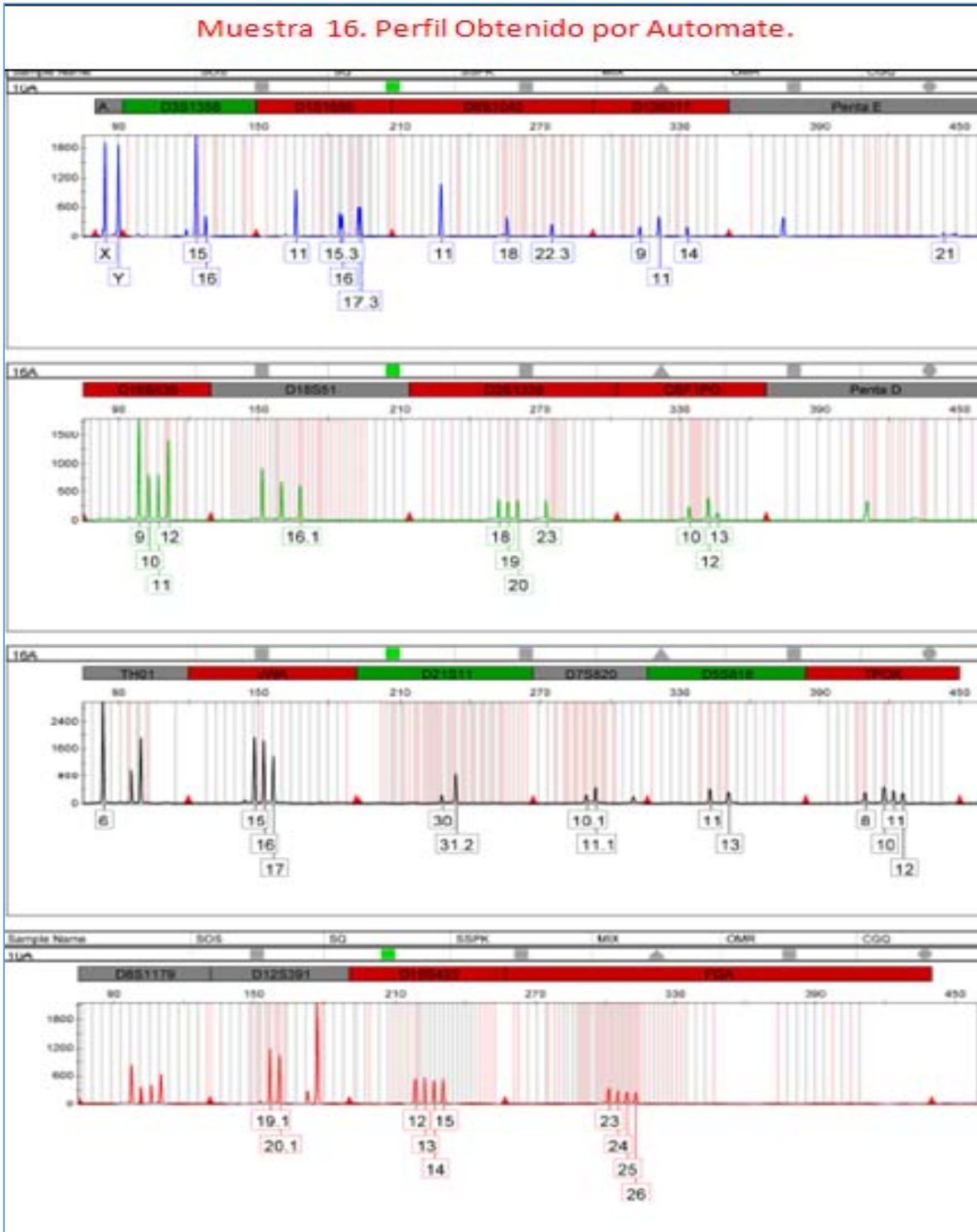
Perfil Genético. Muestra 13, obtenido por Fenol/Cloroformo. Perfil exitoso para identificación humana.



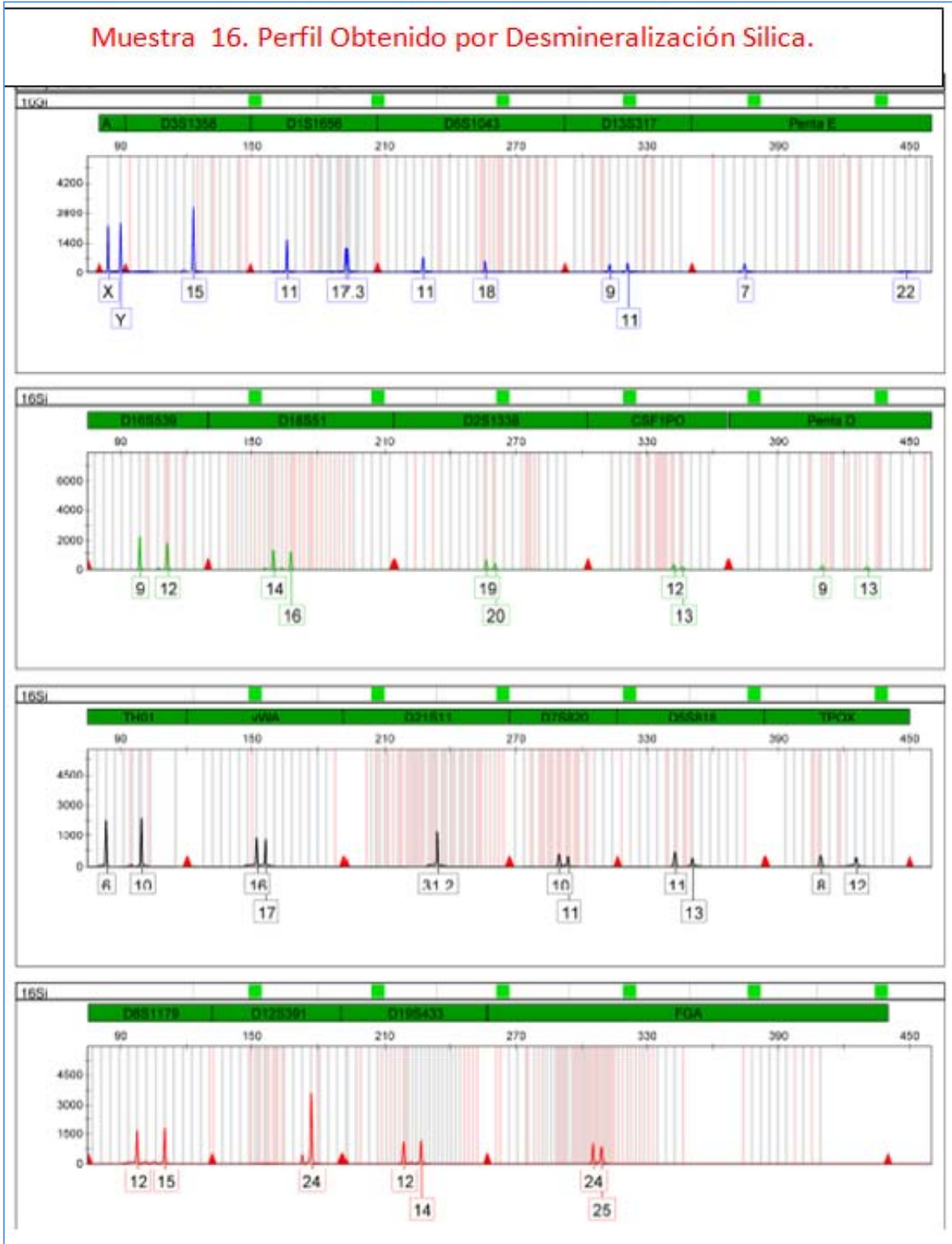
14.-Automate.	0.1530 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
14.- Desmineralización Silica.	0.0520 ng	4ul muestra-30 ciclos	√
14.-Fenol	1.2312 ng/ul	1ul muestra-28 ciclos	√

15.-Automate.	0.2273 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
15.- Desmineralización Silica.	0.1920 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
15.-Fenol	0.1448 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√

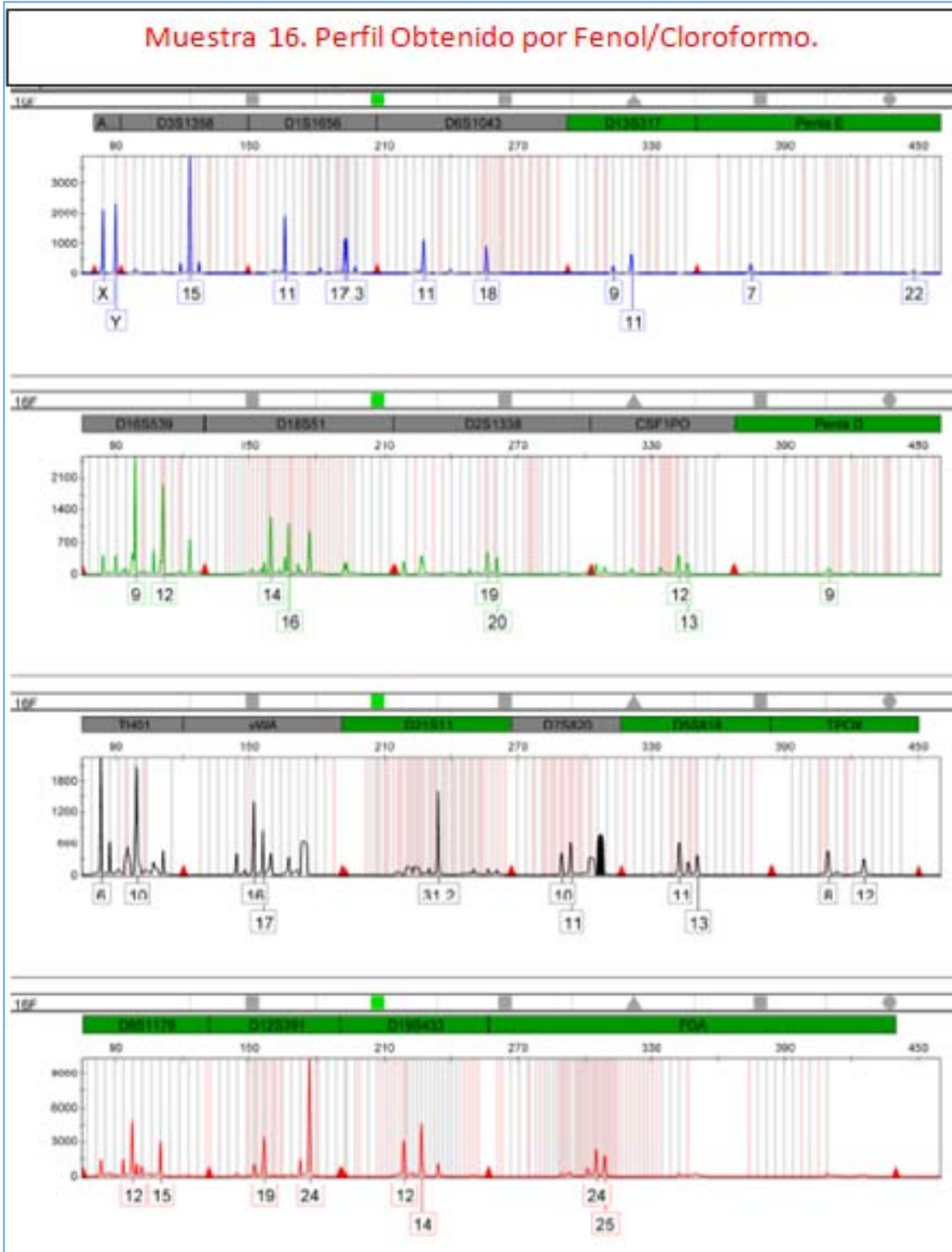
16.-Automate.	0.5147 ng/ul	4ul muestra-28 ciclos	Contaminado
16.- Desmineralización Silica.	0.1085 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	√
16.-Fenol	0.1091 ng/ul	4ul muestra-30 ciclos	Contaminado



Perfil Genético. Muestra 16, obtenido por Automate. Se observa más de 2 alelos por marcador es decir contaminado, Perfil no exitoso para identificación humana.



Perfil Genético. Muestra 16, obtenido por Fenol/Cloroformo. Perfil exitoso para identificación humana.



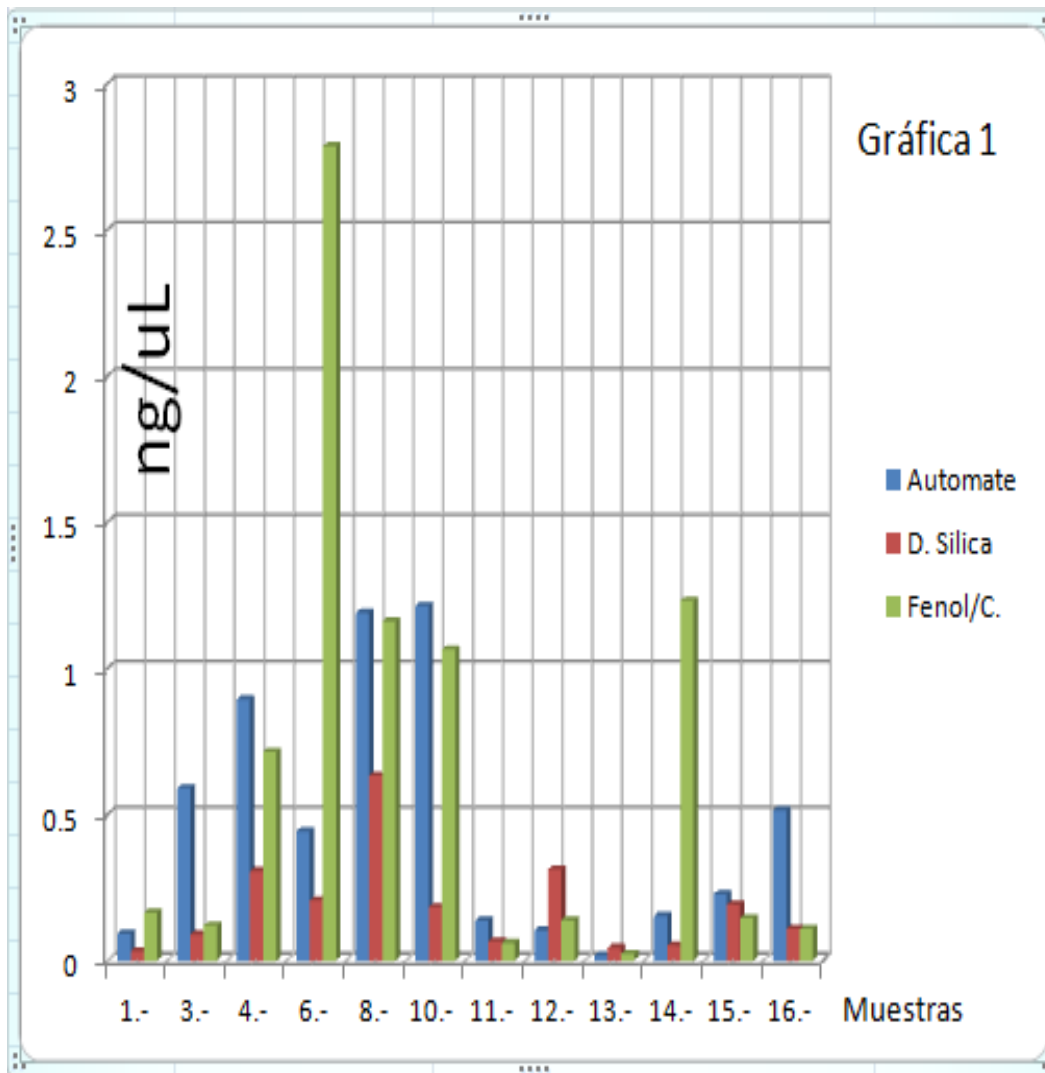
Perfil Genético. Muestra 16, obtenido por Fenol/Cloroformo. Perfil no exitoso para identificación humana.

## 15.1.- RESULTADOS CUANTIFICACIÓN

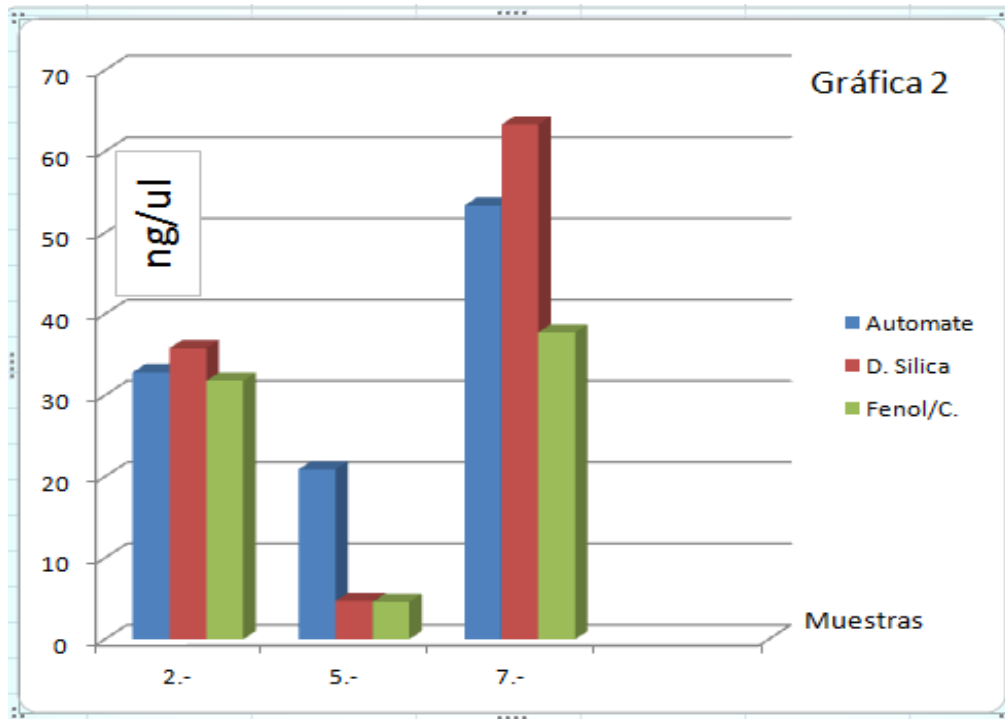
Muestra	Automate	Desmineralización Silica	Fenol/Cloroformo
1.-	0.0925 ng/ul	0.032 ng/ul	0.164 ng/ul
2.-	32.82 ng/ul	35.8 ng/ul	31.798 ng/ul
3.-	0.59 ng/ul	0.09 ng/ul	0.12 ng/ul
4.-	0.894 ng/ul	0.306 ng/ul	0.7141 ng/ul
5.-	20.89 ng/ul	4.705 ng/ul	4.59 ng/ul
6.-	0.442 ng/ul	0.206 ng/ul	2.786 ng/ul
7.-	53.34 ng/ul	63.31 ng/ul	37.73 ng/ul
8.-	1.19 ng/ul	0.633 ng/ul	1.16 ng/ul
9.-	214.25 ng/ul	2259.15 ng/ul	192.290 ng/ul
10.-	1.2135 ng/ul	0.1835 ng/ul	1.0642 ng/ul
11.-	0.1370 ng/ul	0.066 ng/ul	0.0606 ng/ul
12.-	0.1039 ng/ul	0.312 mg/ul	0.1378 ng/ul
13.-	0.0173 ng/ul	0.04513 ng/ul	0.0228 ng/ul
14.-	0.1530 ng/ul	0.0520 ng/ul	1.231 ng/ul
15.-	0.2273 ng/ul	0.1920 ng/ul	0.1448 ng/ul
16.-	0.5147 ng/ul	0.1085 ng/ul	0.1091 ng/ul

Tabla 1. Se observa las cuantificaciones de cada método expresados en nanogramos por microlitros (ng/ul).

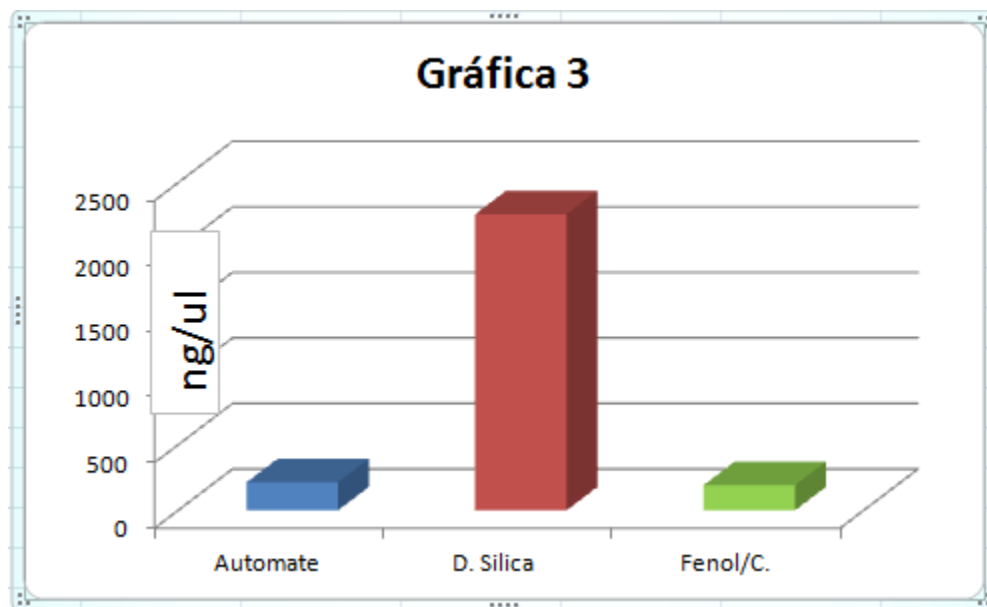
Se realizó la comparación de acuerdo a la cantidad de ADN obtenido en cada muestra, agrupándose en 3 gráficos, en la grafica 1 se observan las muestras con cantidades menores a 3ng/ul, En el grafico 2, se agrupan las muestras aquellas en las cuales al menos una muestra supera los 3ng/ul. La grafica 3, es única para la muestra 9 debido a que se considera un caso especial.



Grafica 1. Se Observa las cuantificaciones de las muestras 1,3,4,6,8,10,11,12,13,14, 15,16 para cada uno de los métodos por un color distinto.



Gráfica 2. Se Observa las cuantificaciones de las muestras 2, 5, 7 para cada uno de los métodos por un color distinto.

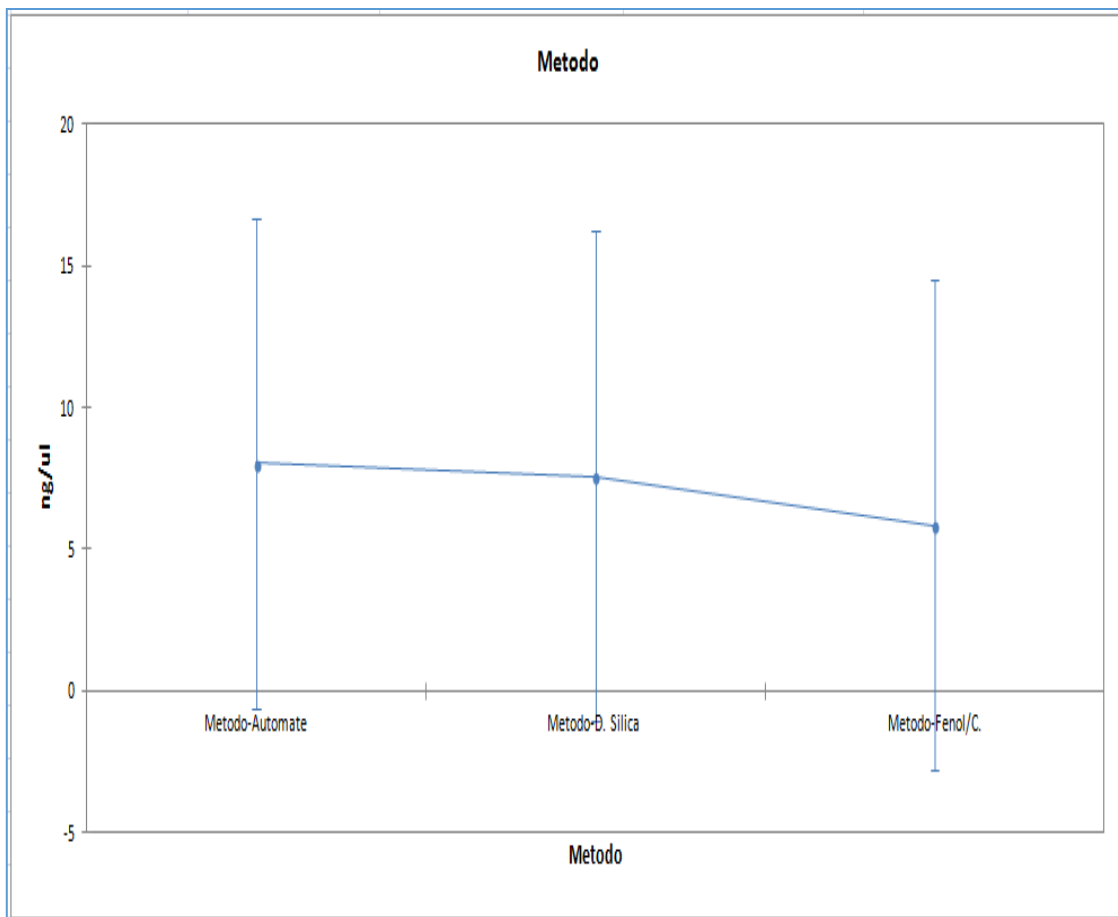


Gráfica 3. Cuantificación de la muestra 9 para cada uno de los métodos  
 Automate 214.25 ng/ul, D. Silica 2259.15 ng/ul, Fenol/C 192.29 ng/ul

Para saber si existen diferencias significativas en las cantidades recuperadas de ADN de los métodos se realizaron 2 pruebas estadísticas, primero la prueba de de Tukey (HDS) (Diferencia honesta de Significativa) y Fisher (LSD) (Diferencia Significativa de Fisher), para intentar evitar en medida de lo posible un sesgo, se eliminaron los datos que se encuentren en ambos extremos de las cuantificaciones, los cuales son la muestra 9 que se encuentra en el extremo superior y la muestra 13 que se encuentra en el extremo inferior.

## 15.2.- PRUEBAS DE TUKEY Y FISHER

Para estas pruebas se ocupó el programa XLSTAT 2015, y los resultados fueron los siguientes:



Grafica 4. Se muestran las medias de las cuantificaciones para cada método, expresadas en ng/ul .



Automate Media de cuantificación = 8.0434 ng/ul

Desmineralización Silica Media de cuantificación = 7.5711 ng/ul

Fenol/Cloroformo Media de cuantificación = 5.8435 ng/ul

**-Prueba de Tukey.** Análisis de las diferencias entre los métodos con un intervalo de confianza de 95%.

Métodos a Comparar	Valor critico	Valor Obtenido	Significativo
D. Silica VS Automate	2.4363	0.997	NO
D. Silica Vs Fenol	2.4363	0.956	NO
Automate Vs Fenol	2.4363	0.930	NO

**-Prueba de Fisher.** Análisis de las diferencias entre los métodos con un intervalo de confianza de 95%:

Métodos a Comparar	Valor critico	Valor Obtenido	Significativo
D. Silica VS Automate	2.023	0.938	NO
D. Silica Vs Fenol	2.023	0.776	NO
Automate Vs Fenol	2.023	0.718	NO

Automate	Desmineralización Silica	Fenol/Cloroformo
Numero de muestras en la que obtuvo el mejor rendimiento de ADN:  <b>9</b>	Numero de muestras en la que obtuvo el mejor rendimiento de ADN:  <b>5</b>	Numero de muestras en la que obtuvo el mejor rendimiento de ADN:  <b>2</b>

## Perfiles Genéticos en Porcentajes

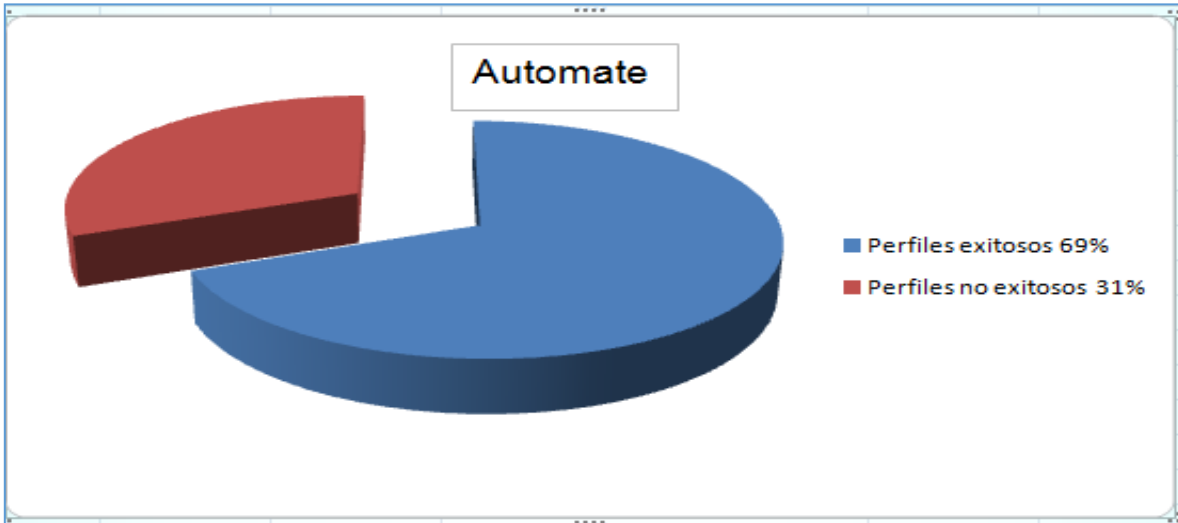


Diagrama 1. Comparación entre perfiles exitosos para identificación humana y perfiles no exitosos. Obtenidos por el Método Automate.

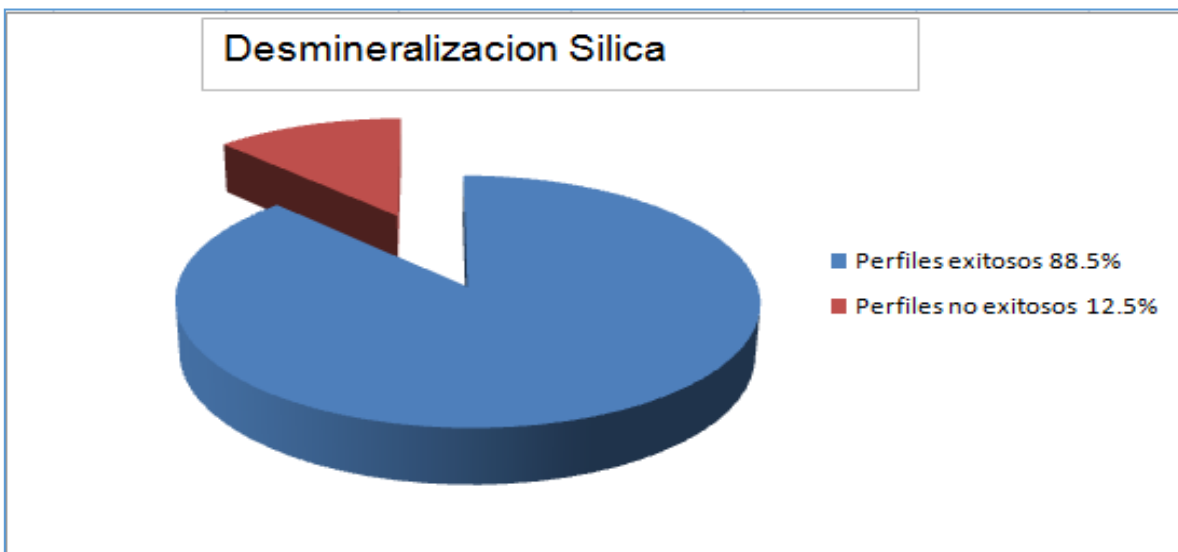


Diagrama 2. Comparación entre perfiles exitosos para identificación humana y perfiles no exitosos. Obtenidos por el Desmineralización Silica.

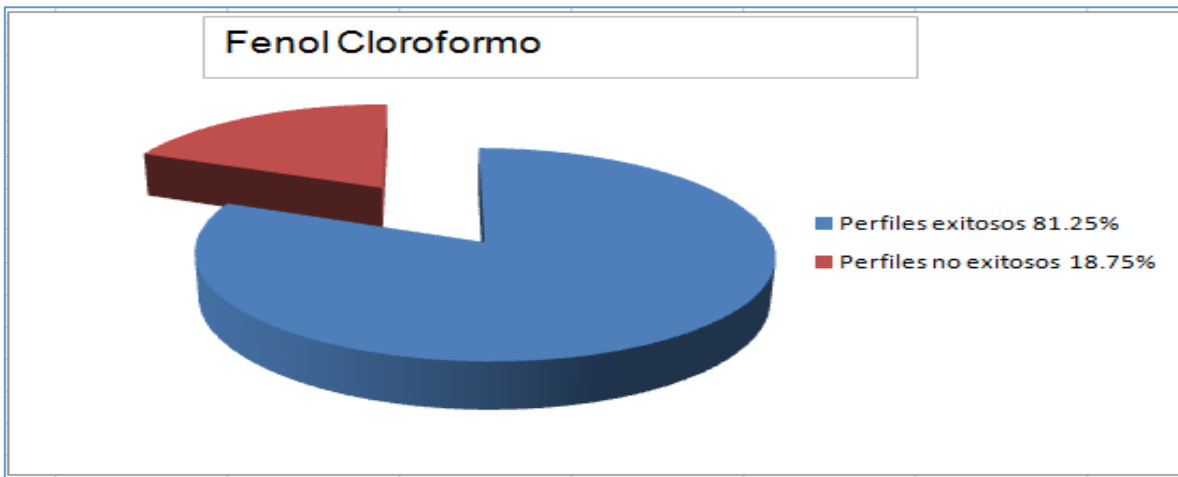


Diagrama 3. Comparación entre perfiles exitosos para identificación humana y perfiles no exitosos. Obtenidos por el Fenol/Cloroformo.

<b>Automate</b>	<b>Desmineralización Silica</b>	<b>Fenol/Cloroformo</b>
Perfiles genéticos Exitosos <b>11</b>	Perfiles genéticos Exitosos <b>14</b>	Perfiles genéticos Exitosos <b>13</b>
Perfiles genéticos no Exitosos <b>5</b>	Perfiles genéticos no Exitosos <b>2</b>	Perfiles genéticos no Exitosos <b>3</b>

### 15.3.- COSTOS

Otro parámetro de comparación que forma parte del trabajo, son los costos (precios) entre los métodos de extracción de ADN, debido a que es un punto importante para que los laboratorios de genética forense puedan o no implementar métodos debido a la capacidad de alcance de cada uno.

#### CUADRO COMPARATIVO DE COSTOS ENTRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Método / Cantidad de Muestras de Extracción de ADN.	Automate Express <sup>tm</sup>	Desmineralización Silica:	Fenol/Cloroformo
Costo por Muestra para la Extracción de ADN.	\$200 M.N.	\$130 M.N.	\$175 M.N
Costo Total de Muestras (16) de Extracción de ADN.	\$3,200 M.N.	\$2,080 M.N.	\$2,800 M.N.

## CUADRO COMPARATIVO DE COSTOS ENTRE MÉTODOS PARA OBTENCIÓN DE PERFIL GENÉTICO.

<b>Método / Cantidad de Muestras de Extracción de ADN.</b>	<b>Automate Express<sup>tm</sup></b>	<b>Desmineralización Silica:</b>	<b>Fenol/Cloroformo</b>
Costo total para perfil genético por muestra. Siguiendo condiciones de proveedores.	\$700 M.N.	\$630 M.N.	\$675 M.N.
Costo total para perfil genético por muestra. Con reducción de volumen.	\$330 M.N.	\$260 M.N.	\$305 M.N.

## 16.- Análisis de resultados

### -Pre- Tratamiento

El cloro funciona de manera general bien en la limpieza de las superficies en restos óseos, sin embargo en algunos casos la contaminación ya es propia de la muestra y no es posible la eliminación solamente utilizando cloro.

### -Extracción y purificación de ADN

La extracción y purificación en el método **Automate Express™** se llevo a cabo de una manera en la cual se comprobó lo enmarcado por el proveedor, lo cual hace que transcurrido el tiempo de digestión de la muestra, se puede obtener ADN en un tiempo de 30 minutos, la cantidad de muestra ocupada (50mg) es una ventaja ya que muestras forenses en ocasiones son pequeñas e incluso en algunos caso únicas, además de realizar hasta 13 muestras a la vez, esto hace que Automate Express™ sea una opción importante a considerar en los laboratorios, los cuales tengan carga de trabajo en cuestión de restos óseos.

Las muestras de ADN obtenidas de Automate Express™ se pueden ocupar en las practicas forenses, extracción y purificación ofrecieron buenos resultados ya que no se presentaron problemas relacionados a extracción o purificación del ADN como podrían haber sido algunos inhibidores, o de falta de ADN.

Sin embargo para poder contar con este método se requiere de equipo especializado, así como la capacitación del personal para poder operar de manera optima la estación de trabajo, también se requiere de consumibles especiales diseñados específicamente para el funcionamiento de Automate Express™, y otra desventaja adicional es que no se pueden realizar modificaciones importantes al método debido a la estandarización del mismo.

En cuanto al método **Fenol/Cloroformo**, se obtuvieron algunos problemas con la purificación ya que se arrastraron inhibidores, seguramente sales las cuales inhibieron la cuantificación (PCR Tiempo Real), la extracción se logro de una manera efectiva en todos los casos, las ventajas de este método es que no

requiere de equipos especializados, se ha comprobado ser un método efectivo y el método por excelencia usado regularmente en los laboratorios de genética forense. Es flexible ya que algunos pasos en el método se pueden ajustar a cada laboratorio.

Los contras de extracción y purificación de Fenol/Cloroformo es el tiempo transcurrido ya que para la descalcificación se llevo al menos para este trabajo 1 mes por muestra, lo cual hace que el método sea lento, el método es laborioso debido a que son muchos pasos incrementando la posibilidad de perder cantidades significativas de muestra, se requiere de mayor cantidad de muestra que en los otros 2 métodos debido a los lavados a los cuales se somete de EDTA, también en este método se ocupa Fenol/Cloroformo el cual presenta un riesgo para la salud de los peritos, y sin embargo en este trabajo se tuvo que realizar un co-purificación, así que no fue tan efectiva su purificación.

El método **Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas** funciona bien en este paso ya que la desmineralización total ayudo a la extracción de ADN, y la Silica en columnas ofreció excelentes resultados en la recuperación de ADN, las ventajas de este método es que no se requiere de equipos especializados para llevar a cabo la extracción, la pequeña cantidad de muestra (50mg) requerida para el método, el tiempo de extracción también es de ayuda debido a que en menos de 1 día se puede contar con un perfil genético, los reactivos empleados no son comparables con los riesgos de Fenol/Cloroformo para la salud , es flexible para adecuar las condiciones en cada laboratorio. No se arrastraron inhibidores a la siguiente etapa y en todos los casos de cuantificación se obtuvieron valores.

Las columnas concentradoras no solo ayudaron a reducir el volumen de la muestra, sino que también funcionaron como coladores de ADN de mala calidad (por debajo de 200 pb), esto ayudo en medida a la eliminación de ADN exógeno, además al reducir el volumen las muestras se pueden manipular de manera más sencilla, adicional a esto los reactivos posteriores también se reducen y con esto

los costos por cada muestra. Se puede decir que el uso de estas columnas ayudan a obtener ADN de calidad para prácticas forenses.

Las desventajas de Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas, primero que nada es un método laborioso por lo cual se requieren de bastantes pasos para obtener el ADN, esto puede aumentar el riesgo de perder cantidad significativa de muestra, así mismo implica riesgos de contaminación ambiental, si el ADN es de mala calidad (menor a 200 pb) se pierde la muestra en las columnas concentradoras, si son muchas las muestras que se trabajan al ser un proceso laborioso puede llevar a equivocaciones humanas y diversas dificultades.

-Cuantificación de ADN (PCR Tiempo Real)

**Automate Express™** resulto ser el método que obtuvo la media más alta (8.434 ng/ul), además el paso previo no arrastro inhibidores así que este método es efectivo en la recuperación de ADN. Este método obtuvo 7 muestras en las cuales fue el que mayor cantidad de ADN recupero.

**Fenol/Cloroformo** fue el método que tuvo el promedio más bajo (5.8435 ng/ul), el método mostro problemas en la purificación ya que se inhibieron algunas muestras (8 muestras), y fue necesario co-purificar una desventaja ya que al tener más pasos se pueden perder cantidades significativas de ADN que en muestras problemas suele ser un riesgo que compromete el estudio. Solo 2 casos fue el que mayor cantidad de ADN tuvo con respecto a los demás métodos.

**Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas** su promedio de ADN (7.5711ng/ul) quedo en segundo lugar detrás de Automate y por delante de Fenol/Cloroformo, no se obtuvo problemas con inhibidores, y en 5 casos fue el que mayor rendimiento obtuvo.

Al inicio del trabajo se esperaba que el método Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas, obtuviera el mayor rendimiento en comparación con los demás métodos, al observar los datos estadísticos nos muestra que en realidad no es mejor el método en cuanto a rendimiento de ADN, si no que en



ninguno de los 3 métodos empelados se encuentran diferencias significativas según la pruebas de Tukey y de Fisher. Por lo cual podemos decir que los 3 métodos resultaron tener resultados comparables sin que ninguno sobresalga de los demás métodos.

La estandarización de la cuantificación al reducir volúmenes a la mitad, dio excelentes resultados, esto ayuda en beneficios para el laboratorio ya que ahora un kit de Quantifiler Duo DNA, puede llevarse a rendir el doble de reacciones, y no generar problemas a sus resultados, esto se ve recompensado en un beneficio económico.

#### -Amplificación de ADN (PCR punto Final)

De manera general para los 3 métodos la amplificación se llevo de manera adecuada mostrando las ventajas de trabajar con un kit que tiene tolerancia a inhibidores los cuales aun estando presentes puede ser amplificado el ADN, sin embargo cabe resaltar en este punto la reducción de volumen de reacción ya que en las recomendaciones del proveedor la muestra en PCR debe ir en un volumen de 25 ul, con 5 ul de mezcla maestra y 5 ul de primer's, sin embargo se comprobó la efectividad de colocar reacciones con un volumen final de 6ul, 1ul de mezcla maestra y 1ul de primer's, con esto el kit que comprende 200 reacciones puede ser optimizado a 1,000 reacciones con lo cual beneficia al laboratorio en cuestiones económicas, los resultados son el mejor parámetro de comprobación para esta adecuación al método recomendado por el proveedor.

No se tuvo problemas con relación a la amplificación de ADN, ya que los ciclos establecidos ( 28 y 30 ciclos), en los parámetros del proveedor el cual recomienda 30 ciclos para no tener problemas de amplificación.

Cabe resaltar que las muestras empleadas en el presenta trabajo son muestras consideradas como muestras problemas, en las cuales las condiciones no son controladas y cada muestra suele estar expuestas a condiciones ambientales

diferentes, por ello recomendamos la prueba de esta estandarización en pruebas con muestras de referencias donde las condiciones son controladas.

#### -Análisis de Fragmentos

Este paso es la conclusión de los pasos realizados anteriormente, en este paso se pueden observar problemas de contaminación, de amplificación y si el ADN recuperado puede ser utilizado para la identificación positiva de una persona.

**Automate Express™** tuvo el porcentaje más bajo de perfiles exitosos (69%) los cuales servirían para identificar a una persona, el problema más frecuente en este método fue el ADN contaminante, ya que se obtenían perfiles pero estos presentaban contaminación ya que observaban más de 2 alelos por marcador, además, esta contaminación hace coherente que haya tenido la mayor cantidad de ADN en el proceso de cuantificación ya que no solo reflejaba el ADN propio de la muestra sino también agentes contaminantes.

**Fenol/Cloroformo** obtuvo un porcentaje de perfiles exitosos de 81.25%, esto nos refleja por que ha sido el método por excelencia en los laboratorio de genética forense, los lavados de EDTA no solo ayudan a la descalcificación de la muestra sino que también ayudan a la eliminación de ADN tanto propio de la muestra como exógeno, es por ello que no se observaron muchos casos de contaminaciones, sin embargo también resulto ser el único método que en una muestra (muestra 3) dio resultados exitoso.

**Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas** obtuvo el porcentaje más alto en la obtención de perfiles genético exitosos de 85.5%, este parámetro es el de mayor importancia debido a que las condiciones anteriores no nos resultan positivas si los perfiles genéticos no nos funcionan para la identificación de personas.

La estandarización del equipo con una inyección de medio tiempo (3 seg) resulto positiva ya que con esto puede darse mayor tiempo de vida media a los capilares, la cantidad de producto de PCR recomendable es de 1ul, pero en este trabajo empleamos 0.5ul y fue suficiente para que salieran los perfiles genéticos de manera adecuada.

La línea de corte de RFU fue mínimo de 100 debido a que se debe tener en cuenta que los restos óseos son muestras problemas, y las demás características como O.L. ( fuera de ladder) u otros artefactos fueron interpretados con la ayuda de un perito en la materia.

**16.1- COMPARACIONES GENERALES ENTRE MÉTODOS**

<b>Automate Express™</b>	<b>Desmineralización Silica</b>	<b>Fenol/Cloroformo</b>
La extracción y purificación puede llevarse a cabo en tan solo 3 horas.	La extracción y purificación puede tomar algunas horas (3-5).	La descalcificación antes de la extracción puede llevar semanas e incluso meses.
El equipo es capaz de procesar 13 muestras simultáneas, y al ser automatizado evita errores humanos.	El método es largo y laborioso por lo cual al trabajar con muestras simultaneas se pueden cometer errores humanos.	El método es largo y laborioso por lo cual al trabajar con muestras simultaneas se pueden cometer errores humanos.
Se lleva a cabo una eliminación de inhibidores de PCR de manera efectiva.	Eliminación efectiva de inhibidores de PCR.	No es efectiva con inhibidores de PCR, por lo cual se deben realizar mas pasos.
El ADN contaminante debe ser eliminado en el pre-tratamiento.	Puede eliminar ADN contaminante durante el proceso de extracción y purificación.	Puede eliminar ADN contaminante durante el proceso de extracción y purificación.
Sistema cerrado que evita posible contaminación cruzada.	Sistema abierto en el cual puede ocurrir contaminación cruzada.	Sistema abierto en el cual puede ocurrir contaminación cruzada.
Requiere equipo especializado al igual que consumibles.	No requiere equipo especializado.	No requiere equipo especializado.
No utiliza reactivos con alto riesgo para la salud.	No utiliza reactivos con alto riesgo para la salud.	Utiliza reactivos con alto riesgo para la salud.

<b>Automate Express™</b>	<b>Desmineralización Silica</b>	<b>Fenol/Cloroformo</b>
Buen rendimiento de ADN pero sin diferencia significativa con los demás métodos comparado	Buen rendimiento de ADN pero sin diferencia significativa con los demás métodos comparado	Buen rendimiento de ADN pero sin diferencia significativa con los demás métodos comparado
Protocolo riguroso no flexible para realizar modificaciones.	Protocolo flexible para realizar adecuaciones.	Protocolo flexible para realizar adecuaciones.
Pocos Laboratorios de Genética Forense en México cuentan con el equipo.	Puede ser implementado en los laboratorios debido a su flexibilidad. Sin embargo se desconoce el número de laboratorios que lo utilizan.	Método por excelencia utilizado en la batería de la mayoría de los laboratorios de genética forense en México.
El método es el más costoso (\$200) de los tres métodos comparados.	Método el cual resulto ser el más económico (\$130) con respecto a los otros dos métodos analizados.	Fue el método que tuvo el precio medio entre los tres métodos (\$175.)

## 17.- CONCLUSIONES

El pre- tratamiento es fundamental en muestras de restos óseos, se observó que el cloro es un buen agente para realizar la limpieza de las superficies de los restos óseos sin embargo no debe descartarse el uso de métodos combinados para lograr la mayor limpieza superficial posible.

El Método Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas no fue el de mejor rendimiento y en los datos estadísticos no existe diferencia significativa entre el método con los otros dos métodos analizados. Se puede concluir que el método es comparable con los resultados obtenidos de un método automatizado (Automate Express™) y con el método Fenol/Cloroformo.

Esto hace que el método Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas sea una alternativa más en la batería de protocolos para los laboratorios forenses, debido a su flexibilidad de uso y de materiales requeridos para poder ser implementado.

Para el presente trabajo fue el método con mayor porcentaje de perfiles genéticos exitosos (85.5%) con lo cual es una alternativa de uso, ya que cada muestra en genética forense es única y con características especiales, por lo cual cada método suele lograr mejores resultados en diferentes condiciones.

Las ventajas sobre otros métodos es que puede estar lista la extracción en pocas horas (3-5 hrs) y obtener un perfil genético en un día. Sin embargo también las ventajas de no requerir equipos especializados, y de no utilizar reactivos tóxicos como fenol/cloroformo.

Está claro que cada laboratorio debe ponderar sus métodos en cuanto a sus necesidades y alcances, es por ello que el método Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas se vuelve una opción importante y probada en diversos estudios para la aplicación forense en México.

Se comprobó que las columnas concentradoras si cumplen el propósito de lograr ADN de calidad y en cantidad para poder ser implementadas en uso forense, aunque el método no haya tenido diferencia con respecto a los demás en cuanto al rendimiento es posible que se puedan realizar adecuaciones específicas de acuerdo a las necesidades del laboratorio a usar el método.

El método Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas logra la obtención de ADN en restos óseos, sin embargo no solo depende del método ya que se deben cumplir los 3 requisitos para lograr el perfil genético (Cantidad de ADN suficiente para el estudio, Calidad de ADN, libre de Contaminantes).

### **-Costos**

Automate Express™ es el método de extracción más costoso de los tres empleados en este trabajo, es cierto que obtiene buenos resultados, y que puede trabajar con 13 muestras simultáneamente, sin embargo el factor económico es un motivo para ser considerado debido al alcance general de los laboratorios en México, ya que además necesita una estación de trabajo que es bastante costoso (<\$600,000 M.N.).

Fenol/Cloroformo el método que está en medio de los tres métodos en cuanto a costo se refiere, al inicio del trabajo se pensaba que este método era el de excelencia en los laboratorios debido a sus buenos resultados en la obtención de perfiles genéticos y al bajo costo, sin embargo en la práctica demostró no ser tan económico.

Desmineralización y Purificación Mediante Silica en Columnas, un método que debe ser considerado para incorporarse a la batería de métodos de los laboratorios de genética forense, debido a que es flexible en diferentes maneras como ya se demostró y aunado a esto fue el método de menor costo una razón de peso para ser implementado.

## 18.- Referencias bibliográficas

- Barrio, P. (2012). "Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense", *Revista Española Medicina Legal*, 39 (2): 54-62.
- Butler, M. J. (2005). "Forensic DNA typing biology, technology, and genetics of STR markers". Elsevier Academic Press, *EE. UU* ,Second Edition. 260pp.
- Butler, M. J. (2006). "Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing". *Forensic Science*, 51 (2) 253-265.
- Butler, M. J. (2011). "Advanced Topics in Forensic DNATyping: Methodology" . *National Institute of Standards and Technology Gaithersburg, Maryland, EE. UU.* 674pp.
- Carey P., J. King., B. Budowle., A. Eisenberg., M. Turnbough. (2011). "Extraction platform evaluations: A comparison of Automate Express™, EZ1\_ Advanced XL, and Maxwell\_16 Bench-top DNA extraction systems", *Legal Medicine*,14 (1) 36-39.
- Coble M. (2009). "An Improved Bone Extraction Protocol at AFDIL". *1<sup>st</sup> Course of Forensic Genetics and Molecular Anthropology México City, México.*
- Comité Internacional de la Cruz Roja (CICR), (2009). "Personas Desaparecidas, Análisis Forense de ADN e Identificación de Restos Humanos". *Guía sobre prácticas idóneas en caso de conflicto armado y de otras situaciones de violencia armada.* Segunda edición. Ginebra, Suiza. 48pp
- Cooper C. (2008). "Forensic Science. Discover the groundbreaking methods scientists use to solve crimes – from fingerprints to DNA sampling". Editions Gallimard. New York. 76pp.
- Checa, M. (2007). "Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones". *Inst. Enf. Resp. Mex*, 20 (3) 213-221.
- Chieri, P. y E. Zannoni, (2005). *Prueba del ADN.* Ed. Astrea. Buenos Aires, Argentina. 264pp.



- Del Valle C. (2002). "Comparación de tres métodos de extracción de ADN de restos óseos". *Informe de práctica de Especialidad*, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 92pp.
- Goodwin W., A. Linacre., S. Hadi. (2011). "An Introduction to Forensic Genetics". A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, Second Edition, 214pp.
- Gunn A. (2006). "*Essential Forensic Biology*". Ed. John Wiley & Sons Ltd. England. 305pp.
- Jeffreys A. (2004). "Huella Genética". *ADN Cambios en la Ciencia y en la Sociedad*. Cap. 6. 45-68.
- Jiménez, G. y B. Bernal, (1999). "Revisión sobre la extracción de ADN a partir de huesos humanos". *Medicina legal de Costa Rica*. 16 (1) 1-2.
- Jobling M. y P. Gill. (2004). "Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. Nature Genetics". *Nature Reviews*. 5 (1) 739-752.
- Juvenal G., D. Gangitano., R. Padula. (2001). "ADN y análisis forense". *CNEA*. 1(4) 21-25.
- Kemp, B. y D. Glenn. (2004). "Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth." *Forensic Science International*. 154 (1) 53-6.
- Kobilinsky L., L. Levine.,H. Margolis. (2007). "Forensic DNA Analysis". *Chelsea House*. New York, EE. UU.
- Loreille O., T. Diegoli ., A. Jodi., Coble M., T. Parsons. (2007). "High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization". *Forensic Science International: Genetics*. 1 (1): 191-195.
- Mestres, F., y J. Vives. (2012). "La resolución de casos abiertos, exoneraciones y análisis familiares por medio de la genética avanzada". *Ciencias Penales y Criminología*. 14 (4) 1-18.
- Miguel, C. (2000). "Electroforesis Capilar". *Bioquímica, Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica A.C. México*. 25 (1) 13-32.

- Novo, F. (2007). "Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina", Madrid España, Pearson Prentice Hall. 237pp.
- Ortega, C., J. Barrera y J. Concepción. (2009). "Identificación Medico Legal por ADN". *Medicina Legal* . 21 (2) 74-83.
- Paredes M. (2009). Genética forense en la identificación de cadáveres". *Identificación de Cadáveres en la Practica Forense*. Cap. 6. 125-150.
- Rada, A. y Taboada L. (1998). "Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular", *Biofarb*,. 6 (1): 63-67.
- Reverte J. (1999). "Antropología Forense". *Ministerio de Justicia, Secretaria General Técnica*. Madrid, España. Segunda Edición. 1054pp.
- Rohland N. y Hofreiter M. (2007), "Ancient DNA extraction from bones and teeth". *Nature Protocols*. 2 (1): 1756-1762.
- Rodríguez C., B. Rodarte, M. Monter. R, Aida. C. Rojas, A, Castañeda y R. Arnaiz.( 2010). "Genética Forense", *Revista Fuente*, 2 (4) 31-35.
- Rodríguez I. y A. Barrera (2004). "La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención", *Ciencia UANL*, 7 (3): 323-335.
- Tamay L. y C. Velasquillo. (2013). "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real". *Investigación en Discapacidad*. 2 (2) 70-78.
- Vallejo G. y A. Alonso. (2009). "La identificación genética en grandes catástrofes: avances científicos y normativos en España". *Revista Española de Medicina Legal*. 35 (1): 19-27.

-van Pelt. E., A . van Belkum., J. Hays (2008). “Principles and Technical Aspects of PCR Amplificación” .*Springer Science Business Media B.V.* 330pp.

-Velasco R. (2004). “La Biología Molecular y el ADN”. *Facultad de Ciencias Agropecuaria*,. 2 (1): 55-60.

-Yount L. (2007). “Forensic Science. From fibers to fingerprints”. Publishers Chelsea House. New York. 225pp.

### **Guías y Manuales:**

-Applied Biosystem 2010. Getting Started Guide 3130/3130x/ Genetic Analyzer Hitachi.

- Quantifiler Duo. User’s Manual. Applied Biosystems 2012.

- QIAGEN .QIAquick® Spin Handbook. 2006.

-Promega. Technical Manual. PowerPlex® 21 System. Disponible en web: <www.promega.com>

-User Guide 2013.AutoMake Express™ Instrument. Extracción de ADN para aplicaciones forenses en el Equipo Automate Express. Life technologies™. Number 4441982. Revisión D.

### **Disponible en Web:**

- Animalpolitico disponible en internet:

<<http://www.animalpolitico.com/blogueros-la-lucha-cotidiana-de-los-derechos-humanos/2014/08/21/mexico-cementerio-de-cuerpos-y-esperanzas-para-migrantes/#axzz3B4PQYpXk>> Consultado el día 25-Agosto-2014.

-Zócalo-Saltillo Disponible en internet:

< <http://www.zocalo.com.mx/seccion/articulo/4-cadaveres-son-hallado-en-narcofosas-1407030339>> Consultado el día 25-Agosto-2014.

-20minutos Disponible en internet:

<<http://www.20minutos.com.mx/noticia/1772/0/explosion/torre/pemex/>>

Consultado el día 25-Agosto-2014.

-Diario. Mx Disponible en internet:

<[http://diario.mx/Nacional/2015-01-10\\_5e85e3cd/en-tres-meses-hallan-70-fosas-con-89-cuerpos-ninguno-de-los-normalistas/](http://diario.mx/Nacional/2015-01-10_5e85e3cd/en-tres-meses-hallan-70-fosas-con-89-cuerpos-ninguno-de-los-normalistas/)> Consultado el día 15- Enero-2015.

## 19.- Glosario

**Alelo:** Formas alternativas en que puede presentarse un gen o un marcador genético.

**ADN:** Siglas de Ácido DesoxirriboNucléico. También DNA. Principal componente de la cromatina (cromosomas). Material hereditario.

**Autosomas:** Cualquier cromosoma diferente a los cromosomas sexuales X e Y. Las células somáticas humanas presentan 22 pares de autosomas (44 en total).

**CODIS:** Siglas de “COmbined DNA Index System”. Conjunto estándar de 13 marcadores STR utilizados por los laboratorios de investigación forense para obtener el perfil genético de una muestra biológica sometida a un análisis forense.

**Cromosoma:** molécula discreta de cromatina que contiene genes o marcadores genéticos. Se encuentran en el núcleo de las células o en la matriz de las mitocondrias.

**Cromosomas sexuales:** Cromosomas responsables del sexo de un individuo. En la especie humana se les designa por X e Y. Cualquier célula somática de un varón lleva el par XY, y cualquier célula somática de la mujer lleva el par XX.

**Electroforesis:** Es una técnica de laboratorio por la cual mezclas complejas de moléculas como ADN proteínas, etc. se separan entre sí en un campo eléctrico. La separación se realiza en función de la carga de la macromolécula y de su tamaño (peso molecular).

**Gen:** secuencia de ADN que puede codificar una proteína, o una molécula que regula la expresión de otro u otros genes.

**Genoma:** Todo el ADN contenido en un organismo o célula, que incluye tanto los cromosomas dentro del núcleo como el ADN en las mitocondrias.

**Genotipo:** Conjunto de alelos presentes en cada célula de un individuo. Constitución genética de un organismo. Para un locus particular, los 2 alelos concretos que se encuentran en él.

**Locus/Loci (plural):** Lugar que ocupa un gen o un marcador en un cromosoma.

**Marcador genético:** Cualquier secuencia de ADN codificante o no, que puede servir para caracterizar a un individuo en una población.

**Mitocondria:** Orgánulo celular que contiene en su matriz un tipo de ADN circular que se hereda a través de las mujeres exclusivamente. En análisis forense se emplean marcadores genéticos del ADN mitocondrial para rastrear linajes femeninos.

**Nucleótido:** Unidad básica del ADN. Consiste en la unión de un glúcido (pentosa), un ácido fosfórico y una base nitrogenada.

**PCR:** Siglas de Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa) Procedimiento que permite sintetizar ADN "in vitro". Permite obtener un número muy elevado de copias de un segmento de ADN.

**Perfil Genético:** conjunto de genotipos que muestra un individuo para un conjunto de marcadores (típicamente los 13 STR's que constituyen el CODIS).

**Polimorfismo:** Característica de un gen/marcador que presenta más de 1 alelo en una población. En el análisis forense se utilizan marcadores muy polimórficos.

**Primer (Cebador):** Una secuencia corta de nucleótidos (oligonucleótido) usada en la reacción de PCR para iniciar la síntesis del ADN que se quiere amplificar

**STR:** Tipo de ADN repetitivo. Siglas de "Short Tandem Repeats" (Repeticiones Cortas en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 2 y 7. En los análisis forenses se utilizan STR's cuya secuencia básica es de 4 nucleótidos.