

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS

CARRERA DE BIOQUIMICA

SELADIS



**INNOVACION TECNOLOGICA PARA EL  
AISLAMIENTO DE ADN HUMANO  
EN RESTOS ÓSEOS**

Elaborado por:

Univ. Alcalá Espinoza Elizabeth J.

**TESINA PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA**

LA PAZ – BOLIVIA

2008

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS

CARRERA DE BIOQUIMICA

SELADIS



**INNOVACION TECNOLOGICA PARA EL  
AISLAMIENTO DE ADN HUMANO  
EN RESTOS ÓSEOS**

Elaborado por:

Univ. Alcalá Espinoza Elizabeth Jimena

Asesora:

Susana Revollo, Ph.D.

Tribunal Docente:

Dr. Bernardo Torrico Arzady, M.Sc.

Lic. Freddy Arce Helguero

TESINA PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA

LA PAZ – BOLIVIA

2008

## AGRADECIMIENTOS

A Dios Padre por:

- Evaristo y Eduarda mis padres, por el infinito amor que me tienen y la ayuda que me dieron para alcanzar lo que hasta hoy he logrado. Gracias por todo!

- A mis hermanos Waldo, Marlene, Maribel, Matilde, Pablo, Ronald y Gary, por todo el tiempo que me dedicaron y el apoyo brindado, mostrándome todo su amor.

- Al Instituto SELADIS que me abrió las puertas para la realización de este trabajo.

- El tiempo, confianza y conocimiento que me ofreció mi asesora Susana Revollo PhD.

- El apoyo incondicional brindado y los consejos de la doctora Rosario Peñaloza.

- Mis amigos Magda, María de los Ángeles, Claudia, Ivlin, Miriam, María, Mónica, Wilma, Ruth, Noemi y Erwin por todo el apoyo que me dieron durante el recorrido de mi carrera.

- Elizabeth Ch. que me enseñó el valor de la amistad, por estar siempre apoyándome y aconsejándome en todo momento de mi vida.

- Freddy B. que me mostró siempre su apoyo incondicional y me enseñó a valorar lo que tengo.

- Jose Q. por enseñarme el valor y significado de cada momento de la vida, por brindarme su amor y confianza incondicional.

Y sobre todas las cosas siempre a mi Creador

GRACIAS DIOS!!!

## *DEDICATORIA*

A Dios por haberme dado la vida y  
A los que cuidaron de ella, mis padres  
Eduarda Espinoza y Evaristo Alcalá.

El principio de la sabiduría  
es el temor de Jehová,  
y el conocimiento del  
Santísimo es la inteligencia

Pr. 9:10

## **TABLA DE CONTENIDO**

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
A. CASOS DE EXUMACION	4
B. RECOLECCION DE MUESTRAS	9
C. CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS	9
a. COMPOSICION	9
D. FUNDAMENTO DEL AISLAMIENTO DE ADN	12
a. EXTRACCION ORGANICA	14
b. EXTRACCION INORGANICA	16
C. PURIFICACION	17
E. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS	18
a. ESPECTROFOTOMETRIA	19
b. ELECTROFORESIS	20
III. OBJETIVOS	23
A. OBJETIVO GENERAL	23
B. OBJETIVO ESPECIFICO	23

IV. MATERIALES Y METODOS	24
A. DISEÑO METODOLOGICO	24
B. POBLACION	25
C. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION	25
a. RECOLECCION	25
b. ELABORACION	26
1. LAVADO	26
2. PULVERIZACION	27
3. AISLAMIENTO DE ADN	28
4. CUANTIFICACION	32
V. RESULTADOS	36
VI. DISCUSION	51
VII. CONCLUSION	55
VIII. RECOMENDACIONES	57
IX. BIBLIOGRAFIA	59

## RESUMEN

En ocasiones resulta de vital importancia para la aplicación de técnicas forenses el análisis del ADN a partir de muestras óseas. Con frecuencia la aplicación de estas técnicas se ve fuertemente afectada por factores tales como la inhibición enzimática, bajos rendimientos, degradación de los ácidos nucleicos. Existen varios procedimientos para la purificación de ADN a partir de muestras óseas, sin embargo, los resultados son muy variables en términos de rendimiento y utilidad del material extraído.

Aquí se describe dos procedimientos útiles para el aislamiento de ADN humano de restos óseos, donde se analizaron 20 muestras por un método convencional y 10 muestras de las anteriores con columnas provistas de resinas, posterior a la extracción se hizo un análisis cualitativo y cuantitativo por espectrofotometría y electroforesis.

Se obtuvieron resultados positivos en espectrofotometría para todos los casos, es decir, todas las muestras presentaron ADN cuantificable, por electroforesis se evidenció ADN por el brillo que este emite al intercalarse con Bromuro de Etidio, el mismo que se evidencia alrededor o en el pozo. La pureza obtenida después del aislamiento fue mayor usando resinas a comparación del método convencional.

El método que mejor resultado ofreció para el aislamiento de ADN humano fue el empleo del Kit con resinas. Sin embargo cuando se requiera procesar un gran número de muestras el método a elegir es el convencional, añadiendo una fase de purificación posterior a la extracción que consiste en usar unos filtros especiales que nos permiten concentrar ADN extraído, obteniéndose una solución más pura, además, por el bajo costo y rápido,



---

## I. INTRODUCCION

En estos últimos tiempos, la revolución genética nos ha traído innumerables sorpresas habiéndonos dado nuevos descubrimientos científicos.

Es muy probable que, en la actualidad, todo mundo haya escuchado hablar de los ácidos nucleicos, en particular del ADN, simplemente por los descubrimientos recientes y por las grandes innovaciones tecnológicas en la investigación del ADN, los cuales no dejan de aparecer casi a diario en los grandes periódicos.

Cuando la muerte es debida a una catástrofe o un homicidio, la identificación de las víctimas puede ser de vital importancia para entregar los cadáveres a sus familiares, para esclarecer como transcurrieron los hechos o para establecer el posible culpable.

La identificación de restos humanos ha sido siempre una de las mayores preocupaciones de las Ciencias Forenses. La huella grafica y la Odontología forense han sido hasta hace poco ciencias que se han ocupado para este propósito. Sin embargo, la aplicación de la Biología Molecular y la Genética en los laboratorios forenses abrió nuevas perspectivas para la identificación directa; en un principio la técnica más utilizada fue la “huella genética”, pero tenía el gran inconveniente de que se necesitaban grandes cantidades de muestra y reciente en buen estado para poder aplicarla. Hoy en día es posible resolver casos donde

---

la cantidad de muestra disponible es mínima y puede estar datada hace cientos de años.<sup>1</sup>

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha convertido en un método indispensable en los Laboratorios forenses, ya que gracias a esta técnica es posible el estudio de muestras que contienen mínimas cantidades de ADN o que lo presentan parcialmente degradado.

De esta manera se pueden analizar muestras en las que antes era imposible pensar que se obtuviera un resultado positivo. Así, hoy en día, incluso está descrita la identificación de sospechosos de estrangulación a través del estudio del ADN de las células epiteliales que ha dejado en el cuello de su víctima, con un éxito de más del 70%.<sup>2</sup>

Siempre que es posible, la identificación de víctimas se realiza mediante comparación con datos ante-mortem, como fichas dentales o radiografías.

Cuando no existe este tipo de información ante-mortem o los restos se encuentran demasiado fragmentados, la identificación positiva es imposible a través de estos métodos.

Hoy en día está ampliamente extendida la identificación genética de las víctimas a través de la comparación con posibles familiares de las mismas, así como a través de la comparación con muestras procedentes

---

de objetos personales (peine, cepillos de dientes, maquinillas de afeitar...) pertenecientes a las propias víctimas.<sup>3</sup>

Sin embargo, la identificación genética puede complicarse cuando existen largos períodos de tiempo entre la muerte y la aparición del cadáver o cuando la muerte ocurrió en unas condiciones críticas (explosiones por ejemplo). La destrucción o descomposición de los tejidos blandos deja sólo huesos y dientes disponibles para el análisis.

Por todo ello hemos de recurrir a análisis alternativos, como el estudio de ADN mitocondrial del cual posiblemente se conserve un número de copias más elevado por encontrarse presente en mayor cantidad en las células que el ADN nuclear; en algunos casos puede resultarnos imprescindible la identificación individual y todos sabemos que el ADN mitocondrial no identifica individuos sino líneas familiares, porque todos los miembros del grupo familiar emparentados por vía materna mostrarán idéntico haplotipo.

En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos que muestran la posibilidad de aislar ADN a partir de restos orgánicos arqueológicos.<sup>4</sup>

Estas muestras tan antiguas pueden aportarnos valiosa información respecto a diversos aspectos como la filogenia de especies extinguidas, o el grado de evolución de especies no extinguidas.

Las estructuras celulares y subcelulares generalmente no se encuentran bien conservadas en los restos arqueológicos, aunque algunas veces es posible recuperar ADN genómico. La aptitud que una muestra antigua tiene para ser susceptible de análisis genético depende del tiempo transcurrido y en mayor medida de las condiciones ambientales a las que ha estado sometida. Casos excepcionales como las bajas temperaturas, la desecación rápida o las altas concentraciones salinas hacen que muestras más antiguas puedan ser estudiadas con éxito relativo.

Este trabajo pretende analizar alternativas para el estudio de ADN nuclear en muestras de restos óseos, optimizando el protocolo de extracción de esta molécula. Recurriendo al uso de métodos como la electroforesis y espectrofotometría para comprobar la efectividad del protocolo seguido.

## II. ANTECEDENTES

### A. CASOS DE EXUMACION

En la investigación pericial de un indicio biológico destacan tres grandes etapas:

- 1) la **búsqueda de evidencias** en la escena del crimen, accidente, etc.
- 2) la **recogida de muestras o evidencias y envío al laboratorio.**

---

### 3) la investigación analítica.

Las normas para la búsqueda, recogida y envío de muestras al laboratorio deben cumplirse con rigor ya que, en muchos casos, de ello dependerá el éxito de la posterior analítica.

Dicha búsqueda en el escenario del crimen ha de ser meticulosa y cuidadosa como la de cualquier indicio, biológico o no. Si bien cada caso es único y es la experiencia la que regula el mecanismo de actuación, se ha de procurar dañar lo menos posible las pruebas y por ello manipularlas sólo lo estrictamente necesario, para lo cual se precintará la zona y se tomarán fotografías y esquemas de la colocación de los diferentes indicios que puedan ayudarnos a la reconstrucción de los hechos.

Se mirará especialmente en lugares donde puedan quedar restos, incluso aunque se hubieran intentado eliminar limpiando la escena. Este es el caso de las zonas de unión de los baldosines de suelo y paredes, la unión entre la hoja y el mango en un machete, el interior de las uñas de la víctima o agresor, la ropa íntima si se sospecha delito contra la libertad sexual, etc.

El uso de sobres de papel en lugar de bolsas de plástico es importante en el caso de indicios biológicos pues el plástico o los recipientes herméticamente cerrados crean condiciones de anaerobiosis que

---

favorecen la putrefacción de las muestras y el crecimiento de hongos en condiciones de humedad.

De todas las muestras recogidas en la Inspección Ocular deberá realizarse el correspondiente **Acta**, en el que consten perfectamente descritos los efectos remitidos, en qué lugar estaban, en qué condiciones y a qué Laboratorio se mandan para su estudio.

Asimismo se expondrá de forma clara y concisa el **tipo de análisis** que se desea sobre cada efecto enviado. Debe existir un documento anejo (**cadena de custodia**) al envío de muestras, que acredite la observación de las mismas en todo momento (durante la toma de muestras, su transporte, la analítica en el Laboratorio, y su devolución al correspondiente Organismo que solicitó el estudio).

Hoy en día es de gran importancia la buena praxis en la recogida y envío de muestras biológicas pues si esta etapa no cumple los requerimientos legales y científicos, la prueba no será admitida en el Juicio Oral.

Si la evidencia no está perfectamente documentada su origen será cuestionado, si no está bien recogida puede perder las propiedades biológicas a estudiar, si no está perfectamente empaquetada puede ser susceptible de contaminación y si no se toman precauciones para evitar putrefacción y descomposición es posible que la muestra no se pueda analizar.

---

Una vez en el Laboratorio, el perito debe realizar también una descripción y numeración de los efectos recibidos, indicando de qué tipo de efecto se trata (cuchillo, navaja, machete, prendas, zapatos, llavero, filtro de cigarrillo, etc.), su color, su forma, su marca, etiqueta y talla si procede, tipo de envoltorio que lo contenía y su estado de conservación.

Es conveniente realizar un reportaje fotográfico de los efectos recibidos antes de proceder a su análisis.

Posteriormente se deben acotar, numerar y describir las zonas de los efectos recibidos que se van a analizar. Por ejemplo, si el efecto recibido es una navaja que presenta una mancha de posible sangre en la hoja y otra en el mango, es interesante analizarlas por separado y ello debe quedar reflejado en nuestro informe pericial, pues pudieran tratarse de dos sangres diferentes si el hecho delictivo es una reyerta.

Podemos realizar una clasificación de las muestras en cuanto a su Identidad en dos grandes grupos:

- ❖ Muestras dubitadas: son los restos biológicos que queremos identificar,

Pues desconocemos a quién pueden pertenecer.

- ❖ Muestras indubitadas: son las muestras biológicas de referencia que conocemos a quién pertenecen y sirven para realizar el cotejo con las muestras dubitadas y así poder establecer una identidad.

En general, cualquier tipo de muestra biológica es analizable en el laboratorio. La mayor parte del material genético de los organismos superiores se halla dentro de las células que lo forman, concretamente en un compartimiento llamado núcleo, aislado del resto de la célula y protegido por la membrana nuclear.

En organismos más simples como las bacterias, el ADN carece de esta protección y está expuesto libremente en el citoplasma de las mismas.

Cada parte de nuestro cuerpo, cada tejido, cada órgano, está formado por diferentes tipos de células especializadas en funciones concretas; así las células musculares tienen totalmente ocupado su citoplasma por miofibrillas musculares de proteínas contráctiles (actina y miosina) que permiten al tejido muscular realizar su función.

Veremos brevemente cuales son los tipos celulares que nos encontramos en las muestras que llegan al Laboratorio de Biología Forense con el fin de entender por qué se logra extraer ADN de dichas muestras.

Los vestigios biológicos que más comúnmente reciben los laboratorios forenses con fines identificativos son: sangre, esperma, saliva, restos orgánicos, pelos, tejidos, uñas, restos óseos y dientes.



---

## B. RECOLECCION DE MUESTRAS

Estos tipos de muestras suelen estar relacionadas con la identificación de cadáveres. En la toma de muestras se procurarán manipularlas lo menos posible, llevar siempre guantes y empaquetarlas lo más próximo a la esterilidad.

Hay que tener presente que, ya que la contaminación del medio está en la superficie del hueso, en el Laboratorio manejaremos probablemente la parte interior. Por eso es importante no cortar el hueso para su transporte y así mantener protegida la zona interior.

## C. CARACTERISTICAS DE LAS MUESTRAS

### a. COMPOSICIÓN

Cuando un cadáver se encuentra en avanzado estado de putrefacción o Ya en su fase de esqueletización, no se ha perdido por completo la materia orgánica.

El tejido óseo está compuesto por:

1.- **Sustancia intercelular**, con dos componentes fundamentalmente distintos, uno es inorgánico (sales de calcio precipitadas, fundamentalmente bajo la forma de cristales de hidroxapatita) y el otro

---

orgánico (fundamentalmente colágeno, mucopolisacáridos sulfatados y algunas glucoproteínas).

Los estudios del hueso calcificado han demostrado que, por peso seco, el 76-77% de la sustancia ósea es inorgánica y el resto orgánica.

**2.- Células óseas:** osteocitos y osteoblastos, rodeadas por la sustancia intercelular. Así, la parte celular del tejido óseo queda encerrada en lagunas pero con capacidad para nutrirse a través de pequeños conductos denominados canalículos.

Tanto osteocitos como osteoblastos son células nucleadas y su número oscila entre 20.000 y 26.000 por  $\text{mm}^3$  en el hueso compacto. Al tratarse de células nucleadas contienen ADN que perdura dentro de la célula.

Esta conservación se explica por la menor concentración de agua y enzimas que hay en este tipo de tejidos y por la protección de la que gozan, en razón de su situación rodeada por una dura barrera mineral, frente a la agresión física y bioquímica de microorganismos.

De entre todos los huesos hay unos que interesan más que otros: aquellos en los que durante la vida del individuo ha habido una mayor actividad celular, son más ricos en ADN. Este es el caso de los huesos en los que se desarrolla la hematopoyesis o generación de células sanguíneas, ricos en médula ósea.

---

En el adulto existen dos tipos de médula ósea: la roja y la amarilla:

La **médula roja** debe su color al gran número de glóbulos rojos que contiene, en diversas etapas de su desarrollo. Así pues, la médula roja es la que produce activamente glóbulos sanguíneos.

La **médula amarilla** debe su color a la gran cantidad de grasa que contiene. Aunque la médula amarilla conserva en potencia la capacidad de producir glóbulos rojos, el hecho de no tener color rojo indica que no trabaja activamente en ello; el hecho de tener color amarillo señala que está dedicada a la tarea menos laboriosa de almacenar grasa.

En el feto, la médula de la mayor parte de los huesos es roja; pero durante el período de crecimiento, en la vida extrauterina, la médula de la mayor parte de huesos se torna amarilla, de manera que en el adulto sólo se halla médula roja, entre otros, en el esternón y las costillas.

A diferencia de los glóbulos rojos maduros (eritrocitos), los inmaduros (eritroblastos) son células nucleadas y por ello fuentes de ADN. En todos los demás lugares, la médula es amarilla.

En conclusión, huesos con abundante médula como un fémur, una tibia, un húmero, un esternón o una costilla son preferibles a una falange. Sin embargo no hemos de olvidar que la degradación del ADN en la médula ósea es mucho más rápida que en la matriz ósea:

Por este motivo es recomendable realizar el aislamiento de ADN de cadáveres antiguos o muy estropeados a partir del tejido óseo compacto por encontrarse en este lugar más protegido el ADN.

En los cadáveres que aún conservan partes blandas pero éstas se encuentran en avanzado estado de putrefacción se pueden utilizar huesos como esternón o costilla y en los cadáveres ya práctica o totalmente esqueletizados es recomendable el uso de huesos para la identificación genética.

#### **D. FUNDAMENTO DEL AISLAMIENTO DE ADN**

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos, es necesario previamente aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares.

Consideramos que la extracción de ADN es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de los ácidos nucleicos.

Durante este proceso existen gran cantidad de sustancias que interfieren provenientes tanto de los propios reactivos de la extracción como de los

---

soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas de interés criminalístico.

Es conveniente obtener una buena cantidad de ADN cuando la muestra lo permite y que éste se encuentre lo más limpio y puro posible, libre de contaminantes como proteínas básicas, ARN, carbohidratos, etc., que pueden bloquear la acción del tratamiento al que someteremos a dicho ADN. Por ejemplo, las proteínas básicas pueden inhibir la entrada de ADN en el gel de electroforesis.

Existen numerosos procedimientos de extracción publicados en estudios que manejan muestras del origen más vario: restos óseos antiguos, manchas de sangre, vellosidades coriales, pelo, etc

Si merece la pena hacer un breve comentario. Los tipos de extracción para muestras forenses en buen estado más habitualmente utilizadas por los laboratorios son la extracción orgánica (Fenol/Cloroformo y sus variantes) y la no orgánica (con resinas quelantes).

El criterio de elección de uno u otro método de extracción no depende sólo del rendimiento en cuanto a cantidad de ADN, sino de su éxito en la reacción de PCR.

---

## a. EXTRACCIÓN ORGÁNICA.

La extracción de ácidos nucleicos sobre muestras biológicas recientes o en condiciones óptimas (como por ejemplo la sangre líquida) sigue un protocolo Estándar, que resulta bastante alterado cuando la muestra está muy deteriorada.

El procedimiento más usual se conoce como "fenol-cloroformo" y tiene fundamentalmente tres etapas:

a) la **digestión** de las proteínas de la muestra con una enzima proteolítica acompañada de un detergente iónico (como SDS) para solubilizar componentes celulares y cloruro sódico.

La enzima que habitualmente se usa es la proteinasa K, pues se inactiva fácilmente por calor para evitar que interfiera en la reacción de amplificación.

La digestión es un paso fundamental del proceso, pues es necesaria la lisis de las proteínas para la extracción de ADN. En este punto pueden interferir ciertas sustancias que inhiben esta lisis y no permiten el acceso a la molécula genética. Otro problema de este paso es que el SDS es un fuerte inhibidor de la enzima Taq polimerasa que se utiliza durante la PCR, por lo que será necesario realizar un paso de purificación para retirarlo.

---

El lisado resultante, además de ADN contiene muchas otras moléculas que deben ser eliminadas en los tratamientos siguientes.

b) la **fenolización** que no es más que el ulterior lavado con una dilución habitualmente de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:24:1). Dicha dilución en su fase fenólica, retiene las proteínas, mientras que en su fase acuosa retiene ácidos nucleicos.

Con cada lavado, se retiran proteínas provenientes de la lisis con proteinasa K, ya que estas disminuyen la pureza del ADN.

c) la **precipitación** del ADN con etanol en presencia de sales (por ejemplo Acetato Sódico) y a bajas temperaturas. Mediante centrifugación, el ADN precipitado formará un sedimento en el fondo del tubo; retiraremos todo el sobrenadante y dejaremos secar el sedimento para que se evapore el etanol y finalmente lo resuspenderemos en el volumen que deseemos de agua o del tampón que nos sea más útil con la finalidad de tenerlo en disolución listo para su estudio.

Con este método se logra retirar las proteínas y otros componentes celulares separándolos de los ácidos nucleicos. El ADN así obtenido es de doble hebra.

---

## b. EXTRACCIÓN INORGÁNICA

La extracción **no orgánica** se realiza con agentes quelantes como la resina Chelex. Dicha resina está formada por copolímeros de estirenodivinilbenceno que contienen iones iminodiacetato que actúan como grupos quelantes.

El procedimiento básico consiste en la maceración y posterior hervido de la muestra en una solución de Chelex al 5% para finalmente añadir el sobrenadante directamente a la reacción de PCR.

Los agentes quelantes son capaces de capturar iones libres en una dilución, lo cual es una ventaja pues dichos iones inhiben la actividad de las enzimas que interviene en la síntesis artificial de nuevo ADN mediante la técnica de PCR.

Además impiden la rotura o degradación del ADN pues quelan los iones metálicos que catalizan la rotura de la hebra de ADN sometida a elevadas temperaturas en condiciones de baja fuerza iónica, de manera que después podamos estudiar la molécula en condiciones óptimas.

Este tipo de extracción produce ADN de hebra sencilla, por lo que se puede usar para análisis del tipo PCR pero no para otros análisis como RFLPs.



---

Las ventajas que presenta el último método descrito con respecto a los métodos orgánicos son: la rapidez de la técnica, su simplicidad, no conlleva el uso de reactivos tóxicos y, cuando se trata de un gran número de muestras, su bajo precio también puede ser un factor a tener en cuenta. Además, este tipo de resinas se puede usar como hemos visto durante la extracción de ADN, o como un paso de purificación después de la extracción orgánica.

### **c. PURIFICACIÓN**

El tratamiento de muestras forenses como pequeñas manchas de sangre, saliva o esperma, resulta algo más complicado en cuanto a la extracción de ADN porque, en última instancia, se obtienen cantidades de dicha molécula muy reducidas.

Uno de los principales problemas que nos encontramos en las muestras forenses críticas es la presencia de sustancias distintas a los ácidos nucleicos que se co-extraen durante el procesamiento de las muestras.

A menudo es difícil separar la muestra de su soporte sin que algunos componentes de éste último pasen al extracto. Estas sustancias pueden interferir en los análisis posteriores por ejemplo inhibiendo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Por ello es conveniente realizar una purificación de los extractos de ADN una vez obtenidos.

---

Con los filtros especiales del tipo Centricon y Microcon (Amicon, USA) se logra esta purificación obteniéndose una dilución final más pura.

Además se logra concentrar el ADN extraído, hecho muy interesante en muestras tan críticas como las nuestras. Estos filtros poseen una membrana hidrofílica con muy baja capacidad de adsorción, lo cual permite el paso a través de ella de gran parte del solvente de nuestro extracto y de todos los solutos de bajo peso molecular, reteniendo los solutos más pesados (ADN). Con ello se consigue concentrar la solución de ADN hasta 80 veces, con una pérdida mínima de éste.

## **E. CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS**

La determinación adecuada de la concentración de ADN en una muestra es muy importante a la hora de desarrollar muchos procedimientos en el campo de la Biología Molecular. Centrándonos en el proceso de amplificación del ADN, tanto el exceso como el defecto de la cantidad de ADN en la mezcla de reacción pueden influir hasta el punto de no obtener ningún resultado en el análisis.

Por ello, es una cuestión primordial el conocimiento de la cantidad de ADN obtenida durante la extracción con el fin de realizar la dilución apropiada para asegurar el éxito de la amplificación.

Además del conocimiento de la cantidad de ADN es también muy importante saber el estado en el cual se encuentra (degradado o no) y si

---

todo el ADN extraído es de origen humano o no, pues ambos parámetros influyen en las reacciones de PCR. Para ello, existen una serie de técnicas que combinadas nos pueden ayudar a la resolución de estas preguntas y que a continuación describimos brevemente.

### **a. ESPECTROFOTOMETRÍA**

Este método se basa en la medida de la cantidad de luz ultravioleta que absorben las bases nitrogenadas. Por ello, está sujeto a interferencias debidas a materiales que habitualmente están presentes en las muestras biológicas.

Niveles significantes de ARN, nucleótidos sueltos o proteínas en solución son algunas de estas sustancias que contribuyen a la absorbancia a 260 nm, resultando así una sobre-estimación de la concentración de ADN en la lectura.

En esta cuantificación se utiliza un espectrofotómetro y se han de realizar lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra de tal manera que resultados de 1 OD (unidad de densidad óptica) corresponderían aproximadamente a 50 µgr/mL de ADN de doble hebra, 40 µgr/mL de ADN de hebra simple y ARN, y aproximadamente 20 µgr/mL de oligonucleótidos de hebra sencilla. El ratio entre las lecturas a

---

260 y 280 nm (OD260 / OD280) dan una estimación de la pureza del ácido nucleico.

Las preparaciones puras de ADN y ARN tienen valores de 1.8 y 2 respectivamente para este ratio. Si existe contaminación con proteínas o fenol, el ratio OD260 / OD280 dará valores significativamente más bajos que los anteriores y no se podrá realizar una cuantificación adecuada de la muestra.

Además el método tiene la desventaja de ser muy poco sensible pues no detecta concentraciones de ADN inferiores a los 250 ng/mL por lo que no suele ser un protocolo elegido en el análisis forense.

## **b. ELECTROFORESIS**

Cuando las muestras pueden estar contaminadas con otras sustancias que absorben la radiación ultravioleta impidiendo una cuantificación con el método anterior, se puede estimar la cantidad de ADN midiendo la fluorescencia inducida por ultravioleta que se produce cuando se intercalan moléculas de Bromuro de Etidio entre el ADN.

Como la cantidad de fluorescencia es proporcional a la masa total de ADN, la cantidad de ADN en la muestra puede estimarse comparándola con la fluorescencia emitida por patrones estándar de cantidad de ADN conocida.

---

El método se suele llevar a cabo sometiendo a las muestras de ADN extraído a un campo eléctrico para que las moléculas se muevan, a través de una matriz de agarosa que contiene bromuro de etidio, en función de su tamaño (la técnica de electroforesis la veremos con detenimiento en el apartado 6 de este trabajo). A la vez que las muestras problema, se procesan muestras de ADN de cantidad conocida (patrones) y por simple comparación de unas con las otras podremos estimar a grosso modo la cantidad de ADN de cada muestra problema.

Se trata de un sistema de cuantificación poco sensible pues es realmente difícil observar en el minigel cantidades de ADN menores que 5  $\mu$ gr totales.

Pero tiene la gran ventaja de que con este método se puede visualizar el grado de degradación de nuestras muestras problema; si el ADN está en buen estado aparecerá en el gel como una banda nítida que no ha recorrido mucha distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto peso molecular, es decir, de gran tamaño. Si, por el contrario, nuestro ADN está fragmentado, aparecerá en el gel una especie de “cola de degradación” (*smear*) a lo largo de la calle en la cual hemos aplicado la muestra debido a que existen fragmentos de diferentes tamaños que recorren diferentes distancias desde el punto de aplicación.

---

En este tipo de muestras degradadas, la cuantificación se hace aún más difícil por no poder realizarse una comparación adecuada con los patrones que son de alto peso molecular y aparecen como bandas nítidas.

Otro problema del método es que no es específico de ADN humano, es decir, detecta cualquier ADN independientemente de su procedencia. Si el ADN extraído es de origen animal, por ejemplo de un perro, lo visualizaremos igual que una muestra de origen humano, si bien existen otros métodos que se pueden realizar antes de la extracción de ADN para saber el origen las muestras problema (por ejemplo, el test de Ouchterlony).

En bastantes ocasiones, las muestras forenses, aunque sean de origen humano, vienen acompañadas de hongos, moho o bacterias si ya han comenzado los procesos de putrefacción.

El ADN de las bacterias es de menor tamaño que el ADN humano, por lo que en teoría serían distinguibles ambos ADNs con una electroforesis en agarosa. Sin embargo, en la práctica esto no es así, ya que normalmente el ADN humano de estas muestras contaminadas está degradado y por tanto pueden existir fragmentos de igual tamaño que el ADN contaminante bacteriano, lo cual hace que sean indistinguibles.

### **III. OBJETIVOS**

#### **A. OBJETIVO GENERAL**

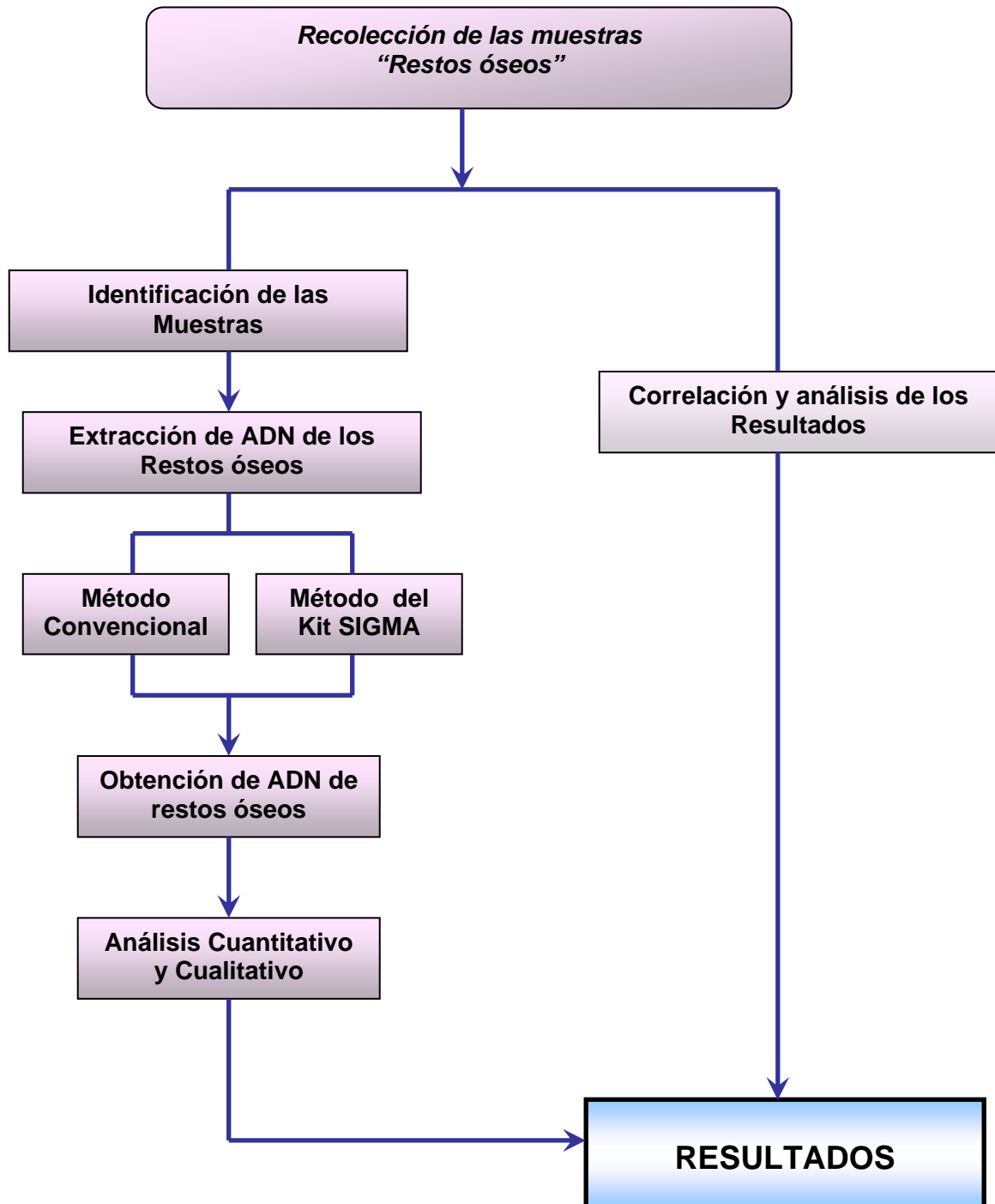
Implementar métodos de aislamiento de ADN en restos óseos para la identificación humana

#### **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Optimizar la extracción de ADN de los restos óseos utilizando un protocolo convencional y un kit comercial (Sigma).
2. Cuantificar el ADN obtenido por ambos métodos, por espectrofotómetro y electroforesis en agarosa.
3. Determinar la calidad de DNA obtenido por ambos métodos haciendo uso del método electroforético.

## IV. MATERIAL Y METODOS

### A. DISEÑO METODOLOGICO





---

## B. POBLACION

La población esta constituida por muestras óseas que comprende los huesos largos, planos y cortos, provenientes de enterramientos en cementerios de la ciudad de La Paz, con edades no fechadas, el estado de conservación vario en dependencia del tipo de muestra, pero mostraban buena consistencia variado en cuanto a color, a partir de los cuales se obtuvo ADN para el análisis. (Anexo 1)

## C. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION

### a. RECOLECCION

Con la prudencia debida se realizo la recolección de los restos óseos, utilizando toda la protección tanto para el recolector (guantes, barbijo, recojo de cabello, ropa protectora) como para las muestras (envases plásticos para cada uno), para evitar cualquier contaminación, luego fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular –SELADIS para su análisis.

Esta recolección o levantamiento de muestras se realizo en los lugares donde se pudo lograr el consentimiento adecuado, con la clara descripción del tipo de estudio a realizarse.

---

## b. ELABORACION

Una vez recolectadas las muestras estas fueron identificadas correctamente indicando el tipo de hueso y numero de muestra que corresponde de la siguiente manera:

### 1. Lavado

Se sacó toda la tierra que se encontraba en la parte externa de los huesos por estar expuesta al ambiente. Luego se lavó con hipoclorito de sodio a una concentración de 0,8 – 1 % hasta que el hueso este completamente limpio, esto se consiguió en aproximadamente unos 15 minutos.

Se enjuagó con abundante agua y varias veces (20 -30 veces) para eliminar completamente el hipoclorito de sodio, una vez escurrida toda el agua de las muestras se extendió en un recipiente donde los rayos de sol lleguen para que sequen y cuando estas secaron se pulverizó.

Se identificó las muestras con números y se almacenó en bolsas plásticas, a la vez se identificó los envases donde se realizó la recolección de las muestras pulverizadas.

---

## 2. Pulverización

Con ayuda de un taladro se perforó uno de los extremos del hueso, ingresando de esta manera al interior del mismo, así se pudo sacar el contenido (células óseas “osteoblastos”) en muchos y pequeños pedacitos. Se recolectó los pedacitos en los envases anteriormente identificados.

Se vació en un mortero de porcelana los pedacitos de hueso obtenido, a estos pedacitos se añadió  $N_2$  líquido (dura 30 segundos aproximadamente) y se procedió a moler con la ayuda de un pilón hasta conseguir que este polvo, luego este polvillo fue vaciado a su envase hasta su procesamiento. Se repitió este paso hasta completar mas o menos 2,5 gramos de polvo de hueso bien fino. (Anexo 2)

(Dependiendo del tamaño del hueso se consumió entre 400 y 500 mL de nitrógeno líquido).

**Nota.** Se debe manipular con cuidado las muestras, cambiándose los guantes para cada muestra así no se contamina.

Tener el cuidado de limpiar el taladro para usar entre una y otra muestra. (Sin descuidar el cuidado que debe tener al manipular dicho equipo)

Contar con protección adecuada para el manipuleo del  $N_2$  líquido.

---

### 3. Aislamiento de ADN

Protocolo para la extracción de ADN a partir de restos Óseos.  
(Método convencional)

En tubos de 15 mL se colocó el polvo del hueso, este sedimento agregado marcaba entre 2 y 3 mL por tanto se aplicó 4 mL de buffer de lisis y 10 uL de Proteinasa K. Se tapó con parafilm, se dio vortex (de 30 a 60 ") y luego se incubó a 56°C en baño Maria agitando de vez en cuando.

Se dejó de 16 a 18 horas incubando, pero es importante mezclar de vez en cuando. Al otro día, luego de las 18 horas, se centrifugó la muestra por 10' a 2500 rpm (No debe ser muy fuerte, es decir mayor de 3000 rpm), se tomó el sobrenadante y se pasó a otro tubo, este sobrenadante se llevó a ebullición a 100°C por 10' para inactivar la proteinasa K.

Se obtuvo 3 mL de sobrenadante se le agregó de 0,5 a 1 mL de NaCl 3M, hasta obtener la precipitación de las proteínas, luego se centrifugó de 5 a 8 minutos y el sobrenadante se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto (o se purifica con etanol absoluto). (Anexo 3)

## Protocolo para la extracción de ADN a partir de restos Óseos. (Método del Kit SIGMA)

### Preparación del Tejido:

La preparación del tejido (hueso) se describió anteriormente. Se pesó 25 miligramos de tejido (pulverizado de hueso).

### Digestión del Tejido:

Se adicionó 180 uL de solución de lisis T (B6678) seguido de 20 uL de proteinasa K al tejido, se mezcló en vortex. Se incubó a 55°C hasta que el tejido este completamente digerido y no haya remanentes, Se mezcla en vortex suavemente.

### Lisis de Células:

Se adicionó 200 uL de solución de lisis C (B880) a la muestra, se mezcló con vortex por 15 segundos. La mezcla homogenizada fue esencial para una eficiente lisis. Se realizó la incubación a 70°C por 10 minutos.

---

## *Aislamiento del ADN a partir del tejido lisado*

### Preparación de la columna

Se añadió 500 uL de la solución preparada a la columna Gen ELUTE Miniprep y se procedió a centrifugar a 12000 g por 1 minuto. Luego se desechó el líquido sobre nadante.

### Preparación por vínculo

Se añadió 200 uL de etanol (95 -100%) al lisado; se mezcló minuciosamente de 5 – 10 segundos en vortex. La homogenización de la solución fue esencial.

### Carga Lisada

Se transfirió el contenido entero en un tubo que contiene la columna. (Emplear una pipeta con tip amplio para reducir cortes de ADN al transferir el contenido a la columna) se centrifugó a > o igual de 6500 g por 1 minuto. Posteriormente se desechó el líquido que queda al fondo y se transfirió la columna a un nuevo tubo de colección.

## Primer Lavado

Antes de usar la solución de lavado (concentrado) se diluyó con 10 mL de etanol al 95 -100%. (Ajustar bien la tapa, para evitar la evaporación del etanol)

Se añadió 500 uL de solución de lavado a la columna y se centrifugó por 1 minuto a  $\geq$  o igual a 6500 g. Se desechó el líquido del fondo del tubo y se colocó minuciosamente la columna a otro tubo de colección nuevo.

## Segundo Lavado

Se añadió otros 500 uL de solución de lavado a la columna, se centrifugó por 3 minutos no mas de 12000 – 16000 g. La columna debe estar libre de etanol para eluir el ADN, para secar el contenido de la columna se centrifugó por 1 minuto adicional. Se desechó el líquido del fondo del tubo y se colocó minuciosamente la columna a otro tubo de colección nuevo.

---

## Elusión de ADN

Se añadió 200 uL de la solución de elusión directamente al centro de la columna. Se centrifugó por 1 minuto a > o igual a 6500 g para eluir el ADN.

Para incrementar la eficiencia de la elusión, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente después adicionar la solución de elusión, luego se centrifugó. (Anexo 4).

## 4. Cuantificación

### Espectrofotometría

La espectrofotometría se basa en la medición de la densidad óptica a dos longitudes de onda a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm corresponde a la máxima absorbanza de luz del ADN y RNA, nos ayuda a realizar el calculo para determinar la concentración de ADN obtenido, sabiendo que 1 Abs equivale a 50 ug/mL, es un método no destructivo, rápido y se puede determinar concentraciones menores a 2,5 ug/mL.



Para determinar la pureza del ácido nucleico se efectúa la lectura a 280 nm, haciendo uso de la razón  $Abs\ 260nm/Abs\ 280nm$ , puesto que las proteínas tienen una absorbancia máxima a 280 nm debido principalmente a residuos de triptofano. Tomando como aceptable el intervalo de valores de 1,6 – 1,8 como pureza de ADN extraído. Un valor más bajo supone una alta contaminación proteica, un valor alto supone contaminación con fenol, lo que caería en una sobreestimación de la concentración

En la práctica se encendió el espectrofotómetro, y se seleccionó la longitud de onda de trabajo. Se realizaron diluciones de las muestras módulo 100X con H<sub>2</sub>O destilada estéril para un volumen final de 3 mililitros. (Volumen requerido para las cubetas de lectura del equipo utilizado). (Anexo 5)

Usando H<sub>2</sub>O como blanco reactivo se realizaron las lecturas de las absorbancias de las muestra a 260nm y 280 nm. Con las lecturas obtenidas a 260 nm. Se realizó el cálculo de la concentración tomando como referencia:

$$ICI = Abs \times 50 \times Fd$$

$$Abs\ 1 = 50\ \mu g/mL$$

Con las lecturas obtenidas a 260 nm y 280 nm se realizó el cálculo de pureza usando:


$$\% \text{ Pureza} = \text{Abs } 260\text{nm} / \text{Abs } 280\text{nm}$$

### Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es usado para la identificación y caracterización de los ácidos nucleicos, este procedimiento permite separar moléculas de ADN y RNA de acuerdo a su peso molecular, influidos por la concentración de agarosa, intensidad de corriente eléctrica y la presencia de sales.

El poder de resolución de los geles de agarosa depende de su concentración que tiene una relación inversa al tamaño de los poros del gel. La visualización se consigue por incidencia de luz ultra violeta de 300 nm de longitud de onda, que permite la fluorescencia del bromuro de etidio que se ha incorporado en la molécula de ácido nucleico durante la preparación del gel.

---

En la práctica se preparó los geles al 0,8%, con 2,5 uL de Bromuro de Etidio para el revelado. (0,8 gramos de agarosa en 100 mL de tampón TE X). Se colocó el tampón de corrida TE X a la cámara electroforética y se introdujo el gel ya preparado y gelificado.

La siembra de las muestras se realizó con el colorante de corrida (azul de metileno), usando de este 10 uL con 10 uL de muestra. Después de la siembra se tapó la cámara y se hizo correr las muestras a 100 voltios por 10 minutos.

Posteriormente se sacó el gel que contiene las bandas de ADN humano, se llevó a un trans iluminador para la visualización de la bandas. Finalmente se tomó una foto con cámara polaroy. (Anexo 6)

## V. RESULTADOS

Se logró aislar ADN humano de restos óseos, haciendo uso de los dos métodos, uno convencional y empleando un kit (SIGMA).

La determinación de la cantidad de ADN extraída de una muestra por cualquier técnica, tiene su importancia según el uso que se le va a dar a la molécula. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

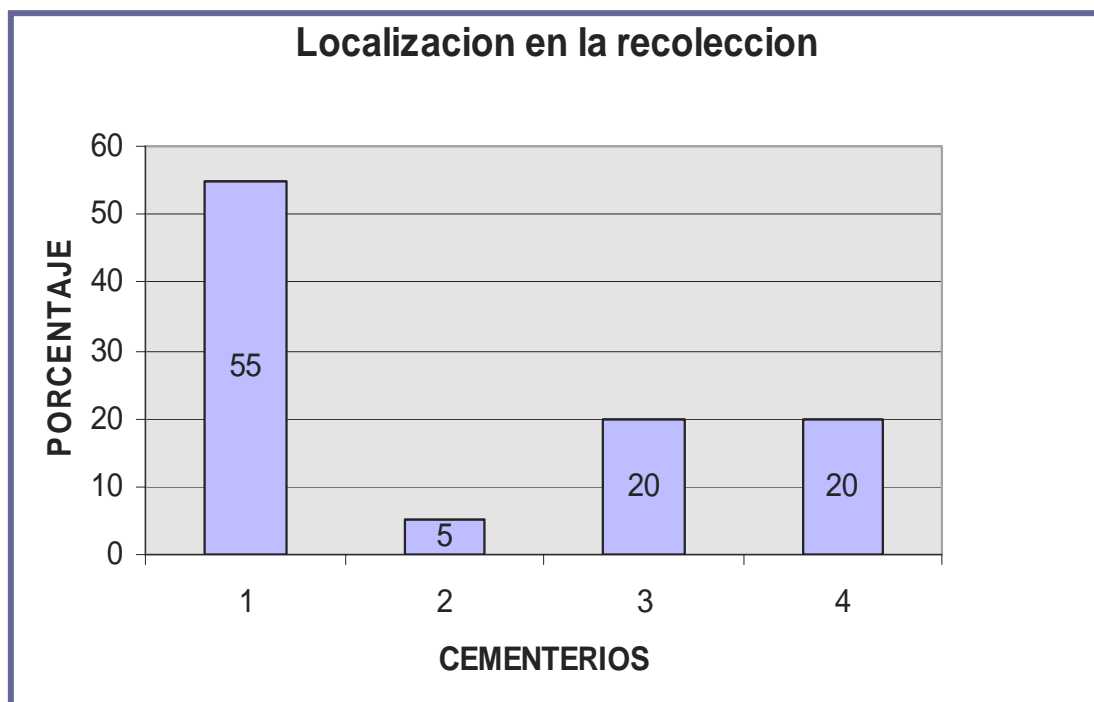
Por el método convencional se realizó el aislamiento de ADN humano de 20 muestras de restos óseos, de estas, 10 muestras fueron tomadas para realizar el aislamiento de ADN humano usando un kit (SIGMA), que corresponden según enumeración de muestras a la 11 y 20 de la tabla.

Estas muestras fueron recolectados en diferentes cementerios de la ciudad de La Paz, con características propias, descritas a continuación. (TABLA 1)

**Tabla 1** Características de las muestras, recolectadas de diferentes cementerios de la ciudad. Usadas para el análisis por los dos métodos.

<b>MUESTRA</b>	<b>TIPO DE RESTO</b>	<b>ESTADO</b>	<b>ANTIGÜEDAD</b>	<b>LUGAR (CEMENTERIO)</b>
1	Fémur	Esqueletizado	No definido	Valle de las Flores
2	Esternón	Esqueletizado	No definido	General
3	Fémur	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
4	Omoplato	Esqueletizado	No definido	Valle de las Flores
5	Húmero	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
6	Omoplato	Esqueletizado	No definido	Santiago I
7	Fémur	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
8	Tibia	Esqueletizado	No definido	Santiago I
9	Cubito	Esqueletizado	No definido	Valle de las Flores
10	Vértebras	Esqueletizado	No definido	Santiago I
11	Fémur	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
12	Tibia	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
13	Fémur	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
14	Tibia	Esqueletizado	No definido	Valle de las Flores
15	Fémur	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
16	Iliaco	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
17	Cubito	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
18	Clavícula	Esqueletizado	No definido	Santiago I
19	Radio	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja
20	Vértebra	Esqueletizado	No definido	Localidad de Laja

**Grafica 1.** Porcentaje de localización de las muestras de restos óseos.  
 1. Cementerio de Laja, 2. Cementerio general, 3. Cementerio Santiago I,  
 4. Cementerio Valle de las Flores.



---

Del total de muestras analizadas, en cada caso se logró obtener ADN humano (100%). Se partió de 2g de hueso pulverizado como cantidad inicial y la cantidad obtenida de ADN humano fue variable desde 16,5 ug/mL como mínimo hasta 180 ug/mL como máximo.

El porcentaje de pureza por este método no cae sobre el rango definido, por la complejidad en el manipuleo de este método, se logró obtener extracciones no del todo puras presentando un grado de contaminación con proteínas.

Este hecho se revela con los valores obtenidos, hallados como anteriormente se explicó, los mismos que corresponde entre 0,9% a 1,6% de pureza del total de muestras analizadas.

De las 20 muestras analizadas 19 muestras presentaron un porcentaje de pureza por debajo de lo aceptable siendo 0,9% el valor mas bajo; evidenciando contaminación con proteínas por ser valores inferiores a 1,6%. Una de las 20 muestras analizadas ingresó al intervalo aceptable presentando un grado de pureza de 1,6%, es decir, libre de proteínas. (Tabla 2).

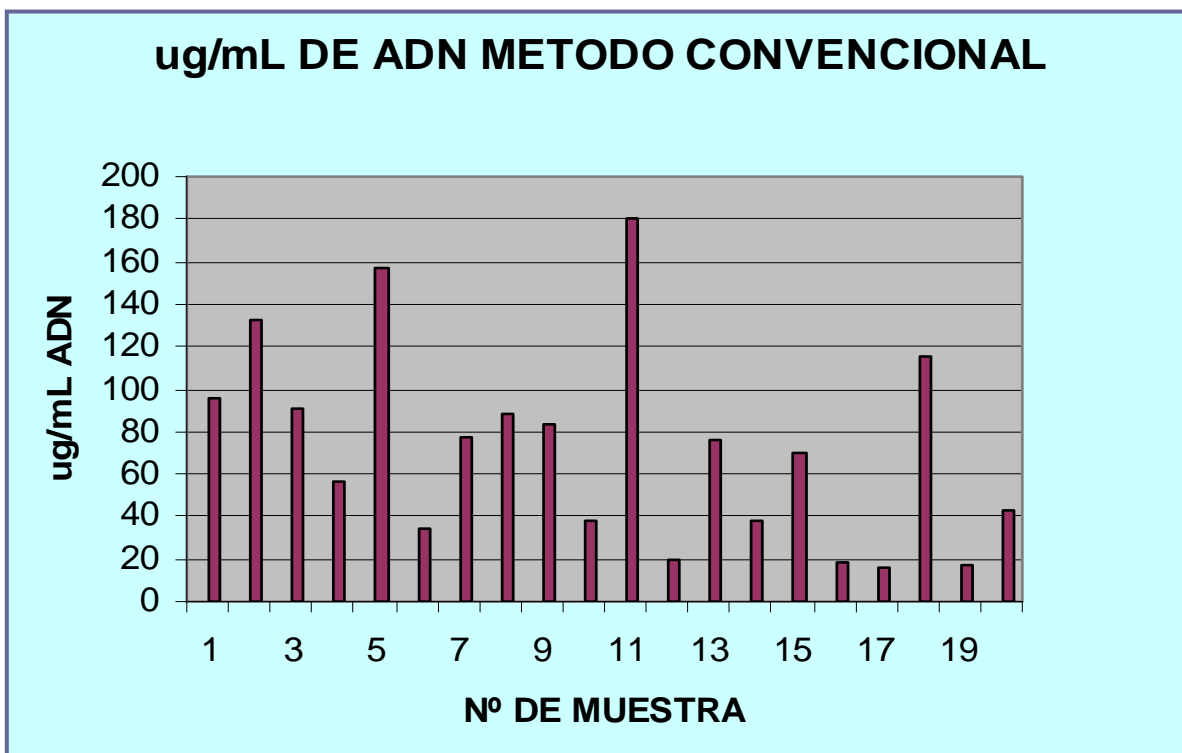
**Tabla 2.** Resultados obtenidos por el método convencional.

M	TIPO DE RESTO	g. INICIALES	Abs 260	Abs 280	ug/mL de ADN	PUREZA	AGAROSA
1	Fémur	2 g.	0,0192	0,0155	96 ug/mL	1,2 %	+
2	Esternón	2 g.	0,0266	0,0199	133	1,3	+
3	Fémur	2 g.	0,0182	0,0134	91	1,3	+
4	Omoplato	2 g.	0,0114	0,0088	57	1,3	+
5	Humero	2 g.	0,0313	0,0261	156,5	1,2	+
6	Omoplato	2 g.	0,0069	0,0054	34,5	1,3	+
7	Fémur	2 g.	0,0154	0,0118	77	1,3	+
8	Tibia	2 g.	0,0177	0,0148	88,5	1,2	+
9	Cubito	2 g.	0,0168	0,0117	84	1,4	+
10	Vértebras	2 g.	0,0077	0,0055	38,5	1,4	+/-
11	Fémur	2 g.	0,036	0,0274	180	1,3	+
12	Tibia	2 g.	0,0039	0,0025	19,5	1,6	+/-
13	Fémur	2 g.	0,0152	0,0115	76	1,3	+
14	Tibia	2 g.	0,0076	0,0055	38	1,4	+/-
15	Fémur	2 g.	0,0139	0,0106	69,5	1,3	+
16	Iliaco	2 g.	0,0038	0,0044	19	0,9	+
17	Cubito	2 g.	0,0033	0,0023	16,5	1,4	+
18	Clavícula	2 g.	0,0231	0,0163	115,5	1,4	+
19	Radio	2 g.	0,0035	0,0024	17,5	1,4	+/-
20	.Vértebra	2 g.	0,0086	0,0061	43	1,4	+



**Grafica 2.** Cantidad de Ácidos Nucleicos obtenidos en ug/mL, utilizando 20 muestras por el método convencional.

1 Fémur, 2 Esternón, 3 Fémur, 4 Omoplato, 5 Húmero, 6 Omoplato, 7 Fémur, 8 Tibia, 9 Cubito, 10 Vértebras, 11 Fémur, 12 Tibia, 13 Fémur, 14 Tibia, 15 Fémur, 16 Iliaco, 17 Cubito, 18 Clavícula, 19 Radio, 20 Vértebra.



---

La evidencia de ADN por electroforesis en gel de agarosa dió resultados favorables, no se logró observar bandas de ADN alejadas del pozo, solo se pudo observar la presencia de ADN en el pozo o alrededor del mismo pues el interés de este estudio solo es evidenciarlo.

En casi todos los pozos puede verse el brillo que emite el bromuro de etidio intercalado en el ADN, excepto en el pozo 10 del primer gel que corresponde a la pieza de vértebra según enumeración de muestra a la diez. (Foto 1)

En el segundo gel también se observa la presencia de ADN, en algunos pozos la intensidad es menor a comparación del resto como en el caso de los pozos 2, 4 y 9, los demás tienen un brillo mayor que está relacionado con la cantidad de ADN extraído de cada muestra.

Estos pozos que presentan menor intensidad de brillo corresponden a las piezas de tibias y radio, según enumeración las muestras doce, catorce y diecinueve respectivamente.

(Foto 2)

Como ya se mencionó, la cantidad de ADN evidenciado por electroforesis en gel de agarosa esta en relación a la cantidad extraída anteriormente a la corrida electroforetica.

---

En la tabla 2 se hace mención de los gramos obtenidos de ADN, los mismos que fueron utilizados para la electroforesis, se puede notar que cuanto mayor ADN aislado se obtuvo mayor fue la intensidad de brillo en los pozos, pues la cantidad de brillo es directamente proporcional a la cantidad de ADN existente en el mismo.

Los pozos que presentan menor intensidad es porque en la extracción de ADN se obtuvo menor cantidad de muestra, por lo tanto se contaba con menor Ácidos Nucleicos.

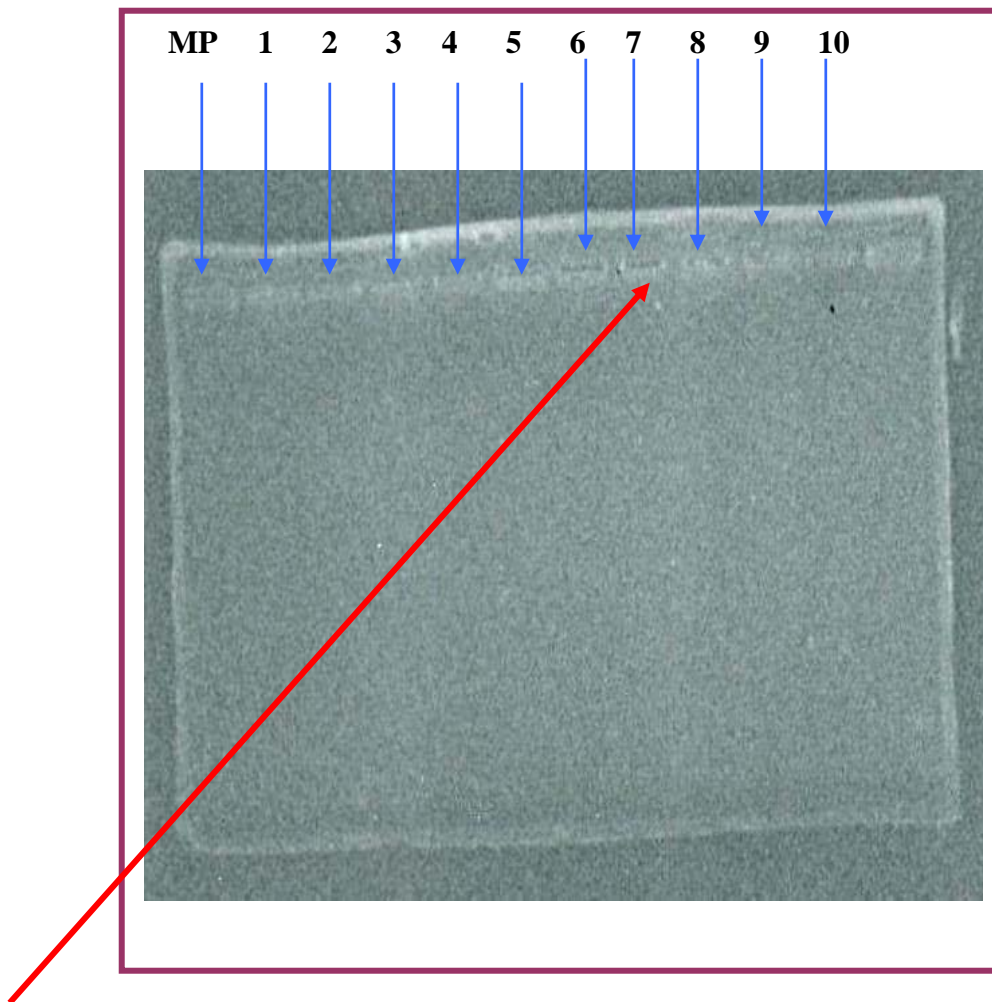
Se usó un marcador de peso molecular para poder tener un aproximado del peso de cada fragmento que posiblemente se hubiera obtenido de las muestras en la corridas electroforetica.

Las muestras obtenidas no presentaron fragmentos y tampoco el marcador de peso molecular, esto por la resolución del gel, a demás con el marcador que se contaba era de fragmentos muy pequeños, y como este se quedo en el pozo de siembra al igual que el resto de las muestras no se pudo inferir sobre el peso molecular de cada fragmento obtenido de cada muestra procesada.

Y como ya se menciona antes, el propósito de la electroforesis fue evidenciar la presencia o ausencia de ADN en cada muestra y correlacionar las mismas con la cantidad de gramos obtenidos cuantificados por espectrofotometría.

**Foto 1.** Corrida electroforética en agarosa, método convencional.

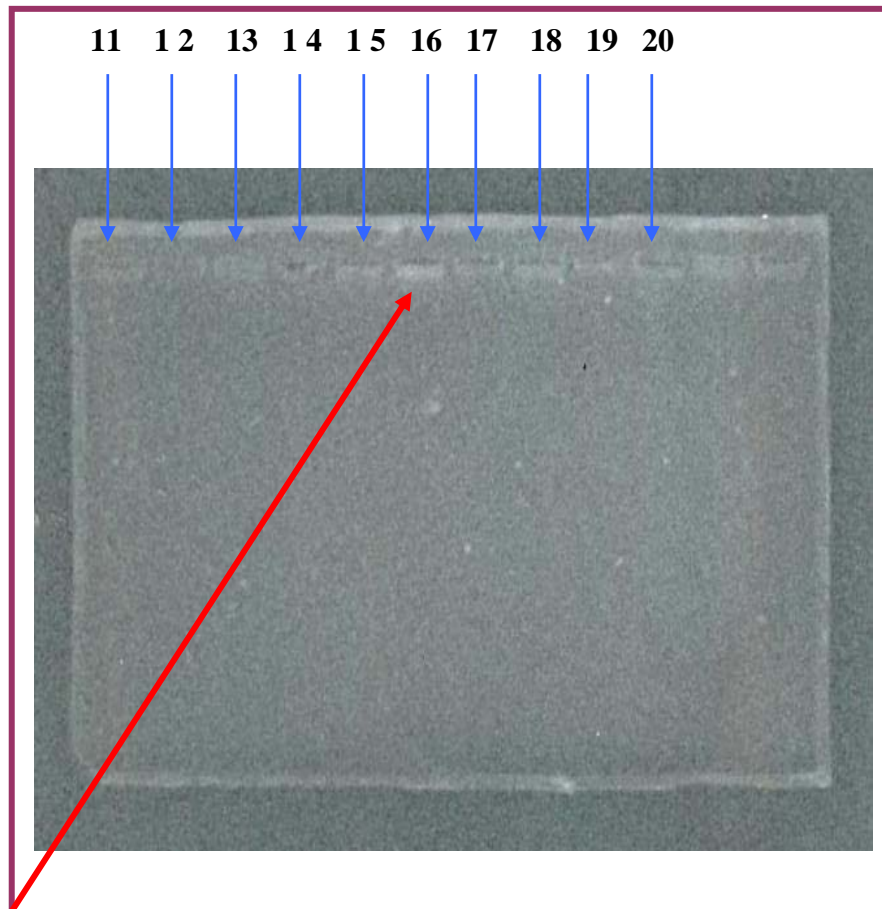
1 Fémur, 2 Esternón, 3 Fémur, 4 Omoplato, 5 Húmero, 6 Omoplato, 7 Fémur, 8 Tibia, 9 Cubito, 10 Vértebras.



Alrededor del pozo se observa un brillo que corresponde a ADN intercalado con Bromuro de Etidio. El ADN no ha recorrido mucha distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto Peso Molecular, es decir, de gran tamaño.

**Foto 2.** Corrida electroforética en agarosa, método convencional.

11 Fémur, 12 Tibia, 13 Fémur, 14 Tibia, 15 Fémur, 16 Iliaco, 17 Cubito, 18 Clavícula,  
19 Radio, 20 Vértebra.



Alrededor del pozo se observa un brillo que corresponde a ADN intercalado con Bromuro de Etidio. El ADN no ha recorrido mucha distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto Peso Molecular, es decir, de gran tamaño.

---

Se realizó el aislamiento de ADN humano de 10 muestras de restos óseos, usando el kit (SIGMA), las mismas muestras que se usaron para el método convencional.

Del total de muestras analizadas, en cada caso se logró obtener ADN humano (100%). La cantidad de hueso pulverizado que se utilizó fue de 0,025 g. La cantidad obtenida de ADN humano fue variable desde 4,5 ug/mL hasta 235 ug/mL.

El porcentaje de pureza usando el kit fue muy aceptable, método que permitió que las muestras puedan abarcar un grado de pureza establecido, debido a la gran facilidad del método y manipuleo del mismo.

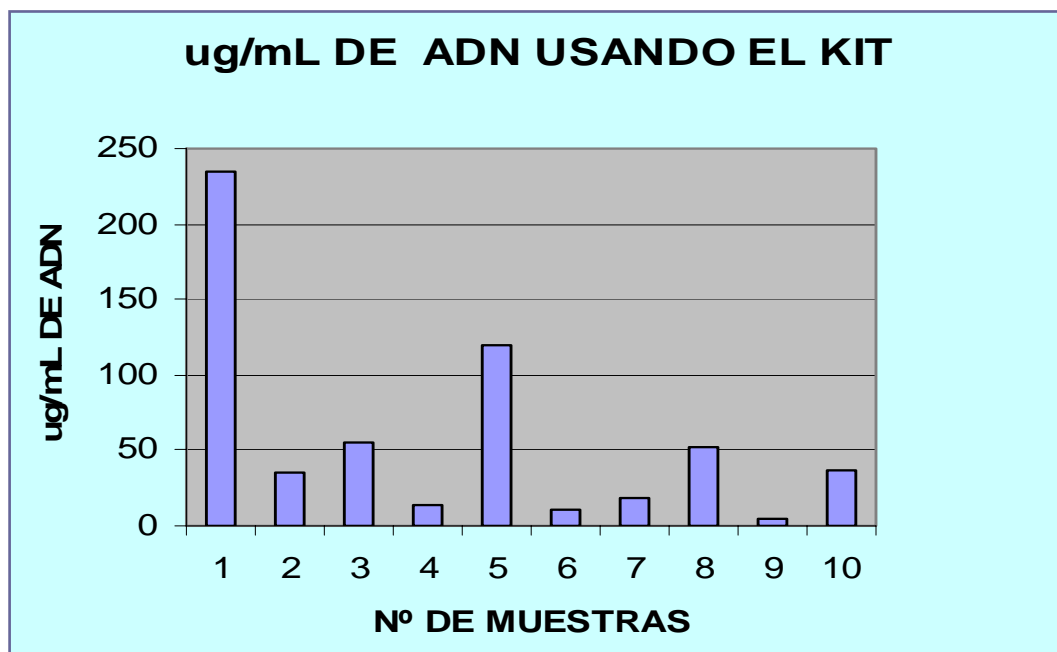
Este hecho se revela con los valores obtenidos de la razón anteriormente explicada, los mismos que corresponden entre 1,5% a 1,8% de pureza del total de muestras analizadas.

De las 10 muestras analizadas 2 muestras presentan un porcentaje de pureza por debajo de lo aceptable siendo 1,2% el valor más bajo; evidenciando contaminación con proteínas por ser valores inferiores a 1,6%. Una de las 10 muestras analizadas está en el límite inferior al intervalo aceptable presentando un grado de pureza de 1,5%, el resto de las muestras están en el rango de lo aceptable, es decir, libres de proteínas. (Tabla 3)

**Tabla 3.** Resultados obtenidos por el método del kit

M	TIPO DE RESTO	g. INICIALES	Abs 260	Abs 280	ug/mL de ADN	PUREZA	AGAROSA
11	Fémur	0,025 g	0,0470	0,0300	235	1,6	+
12	Tibia	0,025 g	0,0070	0,0043	35	1,6	+
13	Fémur	0,025 g	0,0110	0,0062	55	1,8	+
14	Tibia	0,025 g	0,0028	0,0024	14	1,2	+/-
15	Fémur	0,025 g	0,0240	0,0198	120	1,2	+
16	Iliaco	0,025 g	0,0020	0,0011	10	1,8	+
17	Cubito	0,025 g	0,0038	0,0024	19	1,6	+
18	Clavícula	0,025 g	0,0104	0,0060	52	1,7	+
19	Radio	0,025 g	0,0009	0,0006	4,5	1,5	+/-
20	Vértebra	0,025 g	0,0073	0,0045	36,5	1,6	+

**Grafica 3.** Cantidad de Ácidos Nucleicos obtenidos en ug/mL, utilizando 10 muestras por el método del Kit. 11 Fémur, 12 Tibia, 13 Fémur, 14 Tibia, 15 Fémur, 16 Iliaco, 17 Cubito, 18 Clavícula, 19 Radio, 20 Vértebra.





---

La evidencia del ADN por agarosa fue óptima, en todos los pozos se logro ver el brillo característico. Teniendo en cuenta que algunos pozos son mas brillantes que otros. (Foto 3)

En algunos pozos se observa menor intensidad en el brillo, esto proporcional a la cantidad de ADN extraído como en el caso del pozo 14 y 19 donde se cuenta con muy pocas cantidades de material genético, además estas muestras están con grados de pureza inferiores al aceptable, por lo que podría deberse el poco brillo a las proteínas en la muestra intercaladas con el poco acido nucleico obtenido.

En todos los pozos se observa material genético en mayor o menor cantidad según los gramos obtenidos y cuantificados por espectrofotometría. Estos resultados son tan favorables pues se obtuvo a partir de pequeñas cantidades de hueso pulverizado.

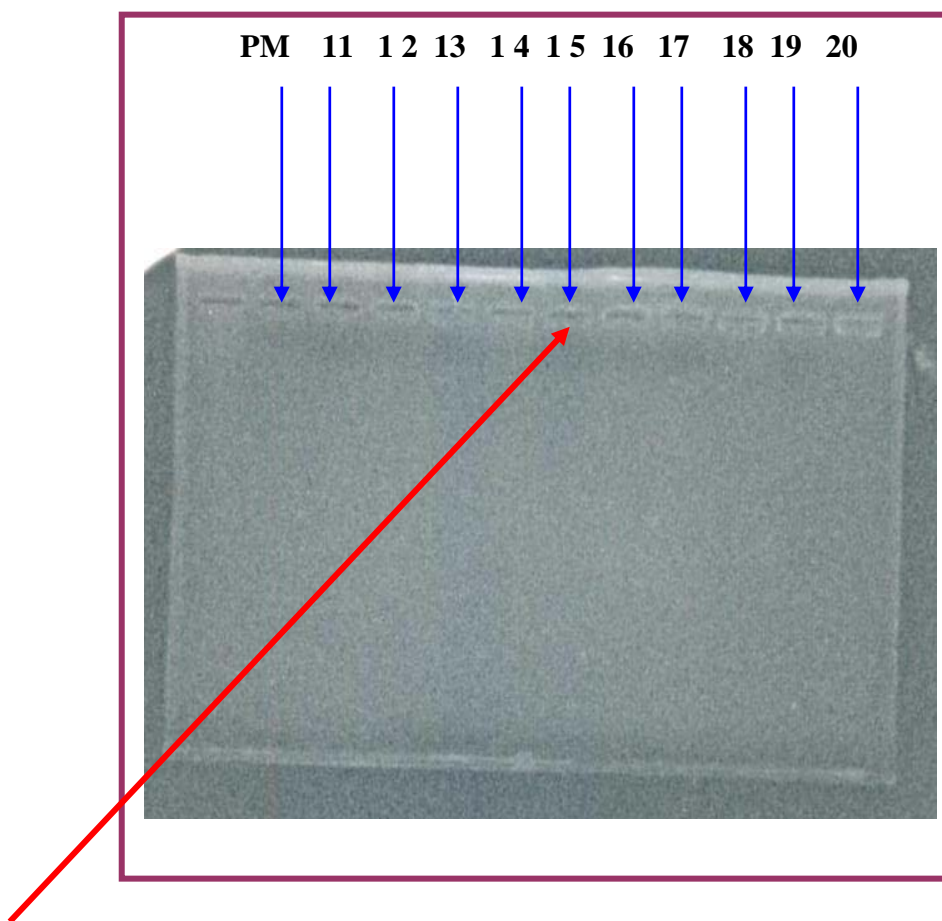
Se usó también un marcador de peso molecular (el mismo marcador de peso molecular que se uso para la corrida de las muestras aisladas por el método convencional), pero no pudo ser separado de manera satisfactoria, debido a la resolución del gel y el tamaño de cada fragmento del marcador.

En el pozo que corresponde a su siembra solo se observa el brillo alrededor del mismo al igual que en el resto de los pozos, confirmándonos la existencia de ácidos nucleicos extraídos, los mismos

que pueden ser utilizados para diferentes análisis y propósitos en el campo forense.

**Foto 3.** Corrida electroforética en agarosa, método del Kit.

11 Fémur, 12 Tibia, 13 Fémur, 14 Tibia, 15 Fémur, 16 Iliaco, 17 Cubito, 18 Clavícula, 19 Radio, 20 Vértebra.



Alrededor del pozo se observa un brillo que corresponde a ADN intercalado con Bromuro de Etidio. El ADN no ha recorrido mucha distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto Peso Molecular, es decir, de gran tamaño.

---

## VI. DISCUSION

Para este trabajo se emplearon huesos con diferente tiempo de enterramiento en condiciones ambientales típicas de la ciudad, con edades no fechadas, el estado de conservación vario en dependencia del tipo de muestra, pero mostraban buena consistencia variado en cuanto a color, a partir de los cuales se obtuvo ADN para el análisis.

Varios métodos han sido descritos por la literatura para la extracción de ADN de restos óseos, aunque con frecuencia se reportan resultados variables con algunas muestras en lo que respecta a rendimiento y calidad del ADN extraído. Es notoria también la influencia del tipo de terreno y las condiciones ambientales de la zona sobre el estado de conservación de los restos y a su vez sobre el rendimiento y calidad del ADN obtenido.

Es importante notar que tanto el rendimiento como la calidad del ADN extraído fueron parámetros muy variables, incluso para restos provenientes de un mismo enterramiento.

Esta falta aparente de regularidad entre las características del material óseo y la cantidad y calidad del ADN extraído se debe muy probablemente a la existencia de contaminantes y otras variables desconocidas hasta el momento y no controladas en el momento de realizar el aislamiento.

---

En este estudio se presenta dos procedimientos que cuando se aplico a diferentes muestras óseas permitió la obtención de ADN humano.

Por el método convencional se obtuvo hasta 180 ug/mL y como cantidad mínima 16,5 ug/mL a partir de 2 g. de muestra a diferencia de estos valores, usando el Kit se obtuvo hasta 235 ug/mL y 4,5 ug/mL de ADN como cantidad mínima, estos valores se lograron partiendo de 0,025 g. de muestra.

El hecho de usar mínimas cantidades de las muestras nos facilita la realización de la extracción de ADN cuando no se cuenta con suficiente muestra, además por la complejidad del método en el proceso de pulverización del material óseo es conveniente el uso del Kit.

La pureza alcanzada por las muestras usando el Kit es óptima, esto debido a la facilidad de contar con una combinación de silica y un formato microscópico que elimina la necesidad de usar costosas resinas, precipitación con alcohol y compuestos peligrosos como fenol – cloroformo.

La solución de partida (solución de lisis) para la extracción, nos permitió desnaturalizar a las macromoléculas y liberar el ADN del interior de la célula, luego del lisado los Ácidos Nucleicos son unidos a la membrana de silica con etanol, asegurando de esta manera el paso de todos los dentritos celulares excepto el ADN, para luego ser eluído con tampón Tris-EDTA obteniendo así un buen ADN en cuanto a pureza.

---

Por el método convencional la pureza alcanzada no fue mas optima que el anterior caso, esto pudo deberse a la complejidad del método en donde el preparado de las soluciones pudo ser un factor determinante para obtener un mejor resultado del obtenido en pureza, puede existir un grado de variación en la concentración, pH, etc. Cuando se realiza la preparación de soluciones en forma manual. Además el aislamiento por este método se basa principalmente en la acción de cada reactivo usado.

El hacer uso solo de centrifugación para separar la fase que contiene el ADN de aquella en la que se encuentran los restos celulares es gran desventaja en comparación del otro método, pues la contaminación con proteínas es mayor en este caso.

La cantidad de muestra para el análisis es también importante, especialmente se debe considerar la conservación y el tipo de clima en donde se encuentra, en los cadáveres embalsamados o conservados, el ADN sufre procesos de degradación que hacen, en la mayor parte de los casos, muy difícil el análisis, por lo tanto necesitar pequeñas cantidades de muestras es también ventaja del Kit.

En cuantos a las corridas de electroforesis en gel de agarosa, se observo en todos los casos ADN, evidenciándose con el brillo que se produce cuando se intercala el bromuro de etidio con las bases nucleicas.

---

En todos los pozos en los que se realizo la siembra se logro observar el ADN alrededor del pozo, No se logro observar bandas pues no se realizo amplificadas del mismo para obtener diferentes bandas de pesos moleculares diferentes, podría haber en casos de fragmentación, que no corresponden a fragmentos específicos , si no a barridos en el gel.

La resolución del gel no permite observar a bandas separadas o alejadas del lugar de siembra (pozo), por tanto la evidencia de ácidos nucleicos se realizo con el brillo alrededor del pozo. Pues el fin de la corrida en electroforesis se limito a determinar la presencia o ausencia de material genético.

El gel que corresponde a las muestras extraídas por el método con kit (Foto 3) muestra mejores resultados, pues a pesar de usar menores cantidades de muestras en la extracción se obtuvo buena cantidad de ADN y con mejor pureza.

El gel que corresponde a las muestras extraídas por el método convencional (Fotos 1 y 2) muestra buenos resultados, con algunas excepciones de algunos pozos en los que casi no se observa ADN en el pozo.

## VII. CONCLUSION

Se ha logrado implementar métodos de aislamiento de ADN humano en restos óseos para la identificación humana. Este éxito en el aislamiento de ADN humano correctamente asignado a una muestra biológica, dependió en gran medida de aspectos relacionados con el adecuado manejo y manipulación de la muestra colectada.

Una buena pulverización de los restos óseos es importante para obtener un buen rendimiento en el aislamiento del ADN, así también el buen lavado, secado y empaquetamiento de la muestra desde su recolección hasta su proceso.

Se ha optimizado la extracción de ADN de los restos óseos humanos utilizando un protocolo convencional y un kit comercial (Sigma). En todos los casos el ADN extraído fue susceptible de ser usado para cualificar, cuantificar, el uso del Kit fue mejor por proporcionar grandes ventajas en cuanto a cantidad de Ácidos nucleicos obtenidos, cantidad de muestra pulverizada requerida, pureza y facilidad en el proceso de aislamiento, careciendo de estas ventajas el método convencional.

En todos los casos se siguió rigurosamente el diseño organizativo (protocolo) descrito para evitar o minimizar posibles eventos de resultados erróneos.

---

Se ha cuantificado el ADN obtenido por ambos métodos, por espectrofotometria y electroforesis. El análisis por electroforesis es importante para evidenciar la presencia de ADN de manera muy efectiva, sin embargo para otro fin que no sea cualitativo si no cuantitativo se recurrirá a otra técnica como la espectrofotometría, procedimiento que se realizo en este trabajo.

Se ha determinado la calidad de ADN obtenido por ambos métodos de las muestra en un gel de agarosa, expresadas en una sola banda junto al pozo.

Sin embargo, creo que en los casos en los que se requiera procesar gran numero de muestras, el método a elegir primeramente es el convencional añadiendo una fase de purificación posterior a la extracción.

Este método se realiza a partir de una cantidad de muestra relativamente pequeña, es sencillo, de bajo coste y en dos días.



---

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se debe tener cuidado en la recolección de las muestras, debido a que estas están con muchos contaminantes biológicos especialmente bacterias.
- Tener cuidado de no contaminar las muestras cuando estas están siendo pulverizadas, además que el operador debe contar con un equipo completo de protección de bioseguridad.
- En el proceso de aislamiento de las muestras se debe manipular con cuidado para no contaminar y degradar al ADN humano.
- Se debe realizar una agitación periódica de las muestras cuando estas están siendo incubadas en baño María a 56°C. con la solución de lisis para que exista una buena extracción.
- Cuando se está inhibiendo la actividad de la proteinasa K tener el cuidado respectivo con el aceite y su punto de ebullición, además tener la seguridad que el material empleado para este proceso sea adecuado (los tubos falcom deben ser resistentes).
- Cuando ya se tiene ADN humano extraído no dejarlo a temperatura ambiente, se debe congelar a -20°C. hasta su cuantificación, para asegurarse que no haya degradación del material genético obtenido.

- 
- Para realizar la cuantificación de los Ácidos nucleicos por espectrofotometria se debe tener en cuenta el volumen final de la dilución, esto dependerá del equipo con que se trabaja, además todo el material debe ser nuevo y no reutilizable.
  
  - Cuando se trabaja con geles de agarosa se debe tener mucho cuidado en el momento de adicionar el Bromuro de etidio por sus propiedades cancerigenas para la piel.
  
  - Ser cuidadoso con el voltaje usado para la corrida electroforética y en el momento de revelado usar gafas protectoras para ver por el transiluminador.
  
  - Un trabajo realizado con el mayor esfuerzo posible siempre tendrá buenos resultados.

---

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. CATTANEO C. y cols, A simple method for extracting ADN from old skeletal material, J. Forensic Sci. 74:167-174.
2. PEÑA E, Biogenética y Biblia, 1: 59-65.
3. LORENTE J, LORENTE M, El ADN y la Identificación en la investigación criminal y la paternidad biológica, 269-274.
4. Estudio de polimorfismo de ADN entre restos antiguos. Universidad de Madrid. [www//ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26242pdf](http://www//ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26242pdf).
5. HOCHMEISTER MN. y cols, Confirmation of the identity of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and typing kits, Journal of Forensic Sciences, 40: 701-705.
6. HOSS M, PAABO S, ADN extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. 21: 3913-3918.
7. JIMENEZ G, ARCE B, Extracción de ADN a partir de huesos humanos, Medicina legal de Costa Rica, 16: 1-10.
8. ACHAVAL A, Manual de medicina legal, ed. Abeledo perrot, 213-250.

- 
9. BAKKER RD, Posmortem examination especific methods and procedures, Filadelfia, Saunders, 35-45.
  10. BEGOÑA M, MARTINEZ J, La prueba de ADN en medicina forense, Masson S.A., Barcelona, España, 168-180.
  11. HARRIS M, Introducción a la antropología general, Ciencias Sociales Alianza, 6: 537-559.
  12. NUÑEZ DE ARCO J, En modulo V, del diplomado en gestión, Ciencias forenses y policiales, Universidad Mayor de San Andres, La Paz, Bolivia, 258-264.
  13. ROCABADO O, CARVAJAL H, CORAH D, El uso del ADN como herramienta de investigación en agresiones sexuales, Rev. De Bioquímica Clínica, 1: 14-16.
  14. QUIROZ A, Medicina Forense, Porrúa, México, 136-137.
  15. REVOLLO S, BORJAS L, CORAH D, La huella del ADN en la identificación forense, 253-275.
  16. BORJAS L., CORACH D., REVOLLO S., El ADN en la Identificación de paternidad y la investigación Criminal. 1; 1-16.
  17. MAMANI J, Clonación humana y derecho, 1: 37-53.

- 
18. VILLAR C, Normalización de los métodos de extracción de ADN humano a partir de manchas de sangre en diferentes superficies, Tesina para optar grado de licenciatura.
  19. HURTADO K, Cuantificación de ADN por electroforesis y espectrofotómetro. Tesina para optar grado de licenciatura.
  20. MOLINA M, Evaluación de métodos de aislamiento de ADN humano en diferentes tejidos biológicos. Tesina para optar grado de licenciatura.
  21. LALUEZA F, CALAFELL F, Secuencias de ADN de restos prehistóricos de cuba; reconstrucción del poblamiento del caribe, 1-15.
  22. PRIETO L, LEON A, GARCIA E, Comparación de distintos métodos de extracción de ADN en restos óseos para análisis de STRs via PCR, 1-12.
  23. ROTHHAMMER F, MORAGA M, RIVERA M. y otros, Análisis de ADN mt de restos esqueléticos del sitio arqueológico de Tiwanaku y su relación con el origen de sus constructores. 1-9.

#### Paginas Internet.

1. <http://www.cnca.gob.mx/cnca/nuevo/2001/diarias/parentes>.
2. <http://www.policia.es/cgpc/t-e-r-oseos.pdf>.

**ANEXOS**

## Anexo 1



Muestra N° 1. Fémur, recogido del cementerio Valle de las flores.



Muestra N° 2. Esternón, recogido del cementerio general.



Muestra N° 3. Fémur, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 4. Omoplato, recogido del cementerio Valle de las flores.



Muestra N° 5. Húmero, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 6. Omoplato, recogido del cementerio Santiago I.





Muestra N° 7. Fémur, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 8. Tibia, recogido del cementerio Santiago I.



Muestra N° 9. Cubito, recogido del cementerio Valle de las Flores.



Muestra N° 10. Vértebra, recogido del cementerio Santiago I.



Muestra N° 11. Fémur, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 12. Tibia, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 13. Fémur, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 14. Tibia, recogido del cementerio Valle de las Flores.



Muestra N° 15. Fémur, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 16. Iliaco, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 17. Cubito, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 18. Clavícula, recogido del cementerio Santiago I.



Muestra N° 19. Radio, recogido del cementerio de Laja.



Muestra N° 20. Vértebra, recogido del cementerio de Laja.

## ANEXO 2



Muestras pulverizadas y recolectadas en tubos falcom, identificadas según numeración correspondientes del 1 al 20.

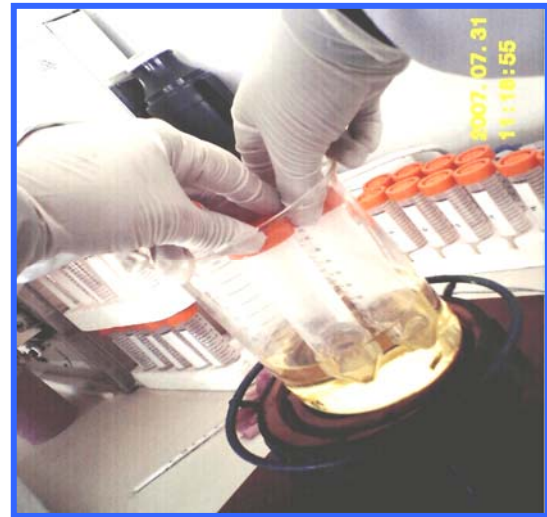
## ANEXO 3



Muestras pulverizadas, tratadas con solución de lisis (Método convencional) en tubos falcom.



Proceso en el que se separa la fase que contiene el ADN del resto celular.



Proceso de desactivación de la proteinasa K, por el método convencional.





Fase de aislamiento de ADN, para su posterior cuantificación.



Fase final del aislamiento, ADN listo para su conservación en tubos falcom, en solución de etanol absoluto.

## ANEXO 4



Muestras pulverizadas, tratadas con solución de lisis (Método usando el kit) en tubos Eppendorf que contienen resinas.



Proceso de separación de ADN por elusión, en tubos eppendorf.  
(Imagen derecha).

## ANEXO 5



Cuantificación de ADN por espectrofotometría de las muestras óseas, así como del método convencional y el empleo del kit SIGMA.



Espectrofotometro UV-ALDRICH, propiedad del laboratorio de Análisis por Instrumental.

## ANEXO 6



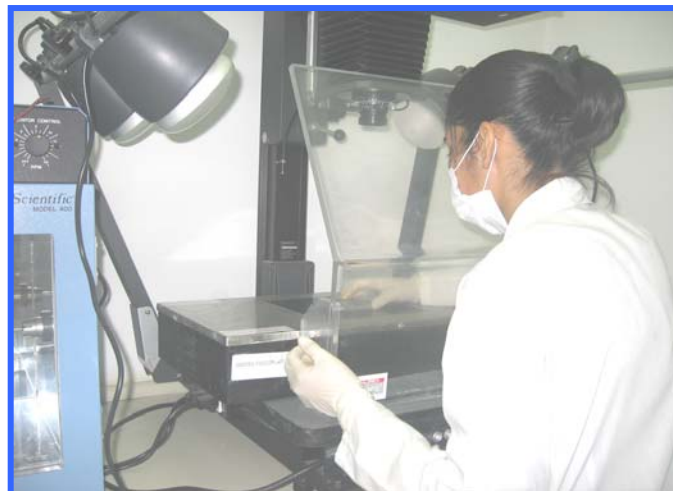
Revelado del ADN por medio de Electroforesis en gel de agarosa.



Proceso de siembra de las muestras óseas aisladas al gel, que esta en la cámara electroforética.



Cámara electroforética, con los gels que contienen las muestras para el revelado.



Revelado de las muestras, en el trans iluminador.