

Protocolo unificado de digestión y descalcificación de tres métodos de extracción de ADN de restos humanos

Wilson Uriel Sierra, Hernando del Castillo-Sabogal*, Tatiana Espitia-Ortiz

Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, Villavicencio, Colombia

Resumen

La identificación de restos humanos esqueletizados con base en el ADN es un procedimiento muy utilizado en los laboratorios forenses del mundo. Existen al menos tres métodos para la obtención del ADN a partir de este tipo de tejido: mediante solventes orgánicos (fenol-cloroformo), columnas de sílice (QIAquick de QIAGEN) y perlas magnéticas recubiertas de polímero (PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit). Cada uno de ellos involucra un procedimiento distinto para la digestión y descalcificación del tejido óseo, así como la aplicación de diferentes principios fisicoquímicos para la purificación y la elución del ADN y el uso de diferentes cantidades iniciales de material pulverizado. Aunque los tres métodos han demostrado ser efectivos dependiendo de la calidad de la muestra, en el Laboratorio de Investigación Genética de Restos Humanos del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses se estandarizó un protocolo unificado para la digestión y descalcificación, independientemente del método de purificación. Con este fin, se evaluaron variables como la cantidad de material pulverizado, el uso y la concentración de detergentes, la concentración de proteinasa K, el uso de dispositivos concentradores y de los reactivos del estuche PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction y EDTA. El efecto de las variables se evaluó en muestras de tejido calcificado provenientes de los casos forenses del Laboratorio y en el ADN de líneas celulares conocidas analizando la cantidad de ADN recuperado y la calidad del perfil genético. El protocolo unificado de digestión y descalcificación permite una digestión completa del material pulverizado y, por ende, una mejor recuperación de ADN, independientemente del método de purificación usado. En las muestras analizadas el método tuvo un porcentaje de éxito cercano a 80 %. © 2017. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.

Palabras clave: Restos óseos; Digestión-decalcificación; Extracción de ADN; PrepFiler Express™; Sílice; Fenol-cloroformo.

Abstract

Unified digestion and decalcification protocol for three DNA extraction methods in human remains

The identification of human remains using DNA from bones and teeth is a current procedure in forensic laboratories worldwide. At least three methods are used in DNA extraction from mineralized tissue: Organic (phenol-chloroform), silica (QIAquick, QIAGEN) and magnetic particles (PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit); each one has its own procedure for decalcification, digestion, DNA purification, and elution, as well as for obtaining the initial amount of material. Although the three methods are equally efficient, we standardized a decalcification-digestion protocol to use it with any of the three DNA purification methods. We evaluated the quantity of powder, detergent and protease concentration, device concentrators and buffer for demineralization in bones and teeth from forensic cases of the Laboratory and DNA of common cellular lines by assessing the amount of recovered DNA and the quality of the genetic profile. The unified protocol for digestion and decalcification allowed a full degradation of bone powder, and good quality DNA recovery, independently of the purification method used in the subsequent step. Success percentage with this protocol was nearly 80 %. © 2017. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.

Key words: Human remains; Digestion-decalcification; DNA extraction; PrepFiler Express™; Silica; Phenol-chloroform.

Introducción

La identificación de restos humanos mediante el ADN es una de las herramientas más poderosas en la investigación forense. La tipificación de los marcadores nucleares y del ADN mitocondrial permite obtener información genética de los restos, incluso después de largos periodos, o cuando

su estado se ha visto afectado debido a las condiciones ambientales a las que estuvieron expuestos (Gill, *et al.*, 1994), (Uzair, *et al.*, 2017).

*Correspondencia:

Hernando del Castillo Sabogal, hdelcastillo@medicinalegal.gov.co

Recibido: 28 de septiembre de 2017

Aceptado: 16 de noviembre de 2017

El paso inicial para la obtención de ADN es la digestión o lisis del tejido, lo cual precisa de la acción de alguna proteasa y de detergentes que ayudan a liberar los contenidos celulares; aunque el ADN se puede obtener de diferentes tipos de tejidos, en los procesos de identificación lo usual es recurrir al material esquelizado, es decir, tejido calcificado, huesos y dientes (**Higgins & Austin**, 2013).

Los huesos están constituidos por tejido conectivo formado por una matriz proteica, principalmente colágeno de tipo I y osteocalcina, por sales minerales y por células. Se distinguen tres tipos de células en el hueso: el osteoclasto, el osteocito y el osteoblasto. El primero proviene de la circulación, tiene origen hematopoyético y está involucrado en el remodelado del hueso, en tanto que el osteoblasto es responsable de la generación de la matriz, lo que incluye la segregación de proteínas y su mineralización; por su parte el osteocito es el principal componente celular del hueso y corresponde a la diferenciación final del osteoblasto, parece una célula aislada dentro de la matriz, pero desarrolla prolongaciones citoplasmáticas que permiten la conexión con otras células (**Montecinos & Zeni**, 2009; **Bonewald**, 2011).

La obtención de ADN a partir de tejido calcificado es un proceso dispendioso que puede resultar poco efectivo por cuenta del deterioro de las moléculas y los efectos adversos del entorno ambiental; la extracción de la molécula a partir de este tipo de tejido precisa una desmineralización previa con agentes quelantes de iones divalentes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (**Edson, et al.**, 2004; **Frias, et al.**, 2012).

En los restos óseos una buena parte del ADN se encuentra asociado a la matriz mineralizada, específicamente a la hidroxiapatita, por fuera de las estructuras celulares remanentes (**Collins, et al.**, 2002; **Żołądziewska, et al.**, 2002). Por ello, si se efectúa un proceso de desmineralización y se descarta el agente desmineralizante, se corre el riesgo de perder una buena parte del ADN. Es por eso que se han propuesto métodos de desmineralización y digestión simultáneos, con el fin de reducir la pérdida de ADN durante el proceso (**Loreille, et al.**, 2007). Sin embargo, estas metodologías generalmente están ligadas a un solo método de purificación, que es el proceso siguiente e implica la separación de la molécula de interés del resto del material digerido.

Tradicionalmente, se ha utilizado la extracción orgánica con fenol-cloroformo como principal método de purificación; no obstante, dado el alto grado de toxicidad de los reactivos y el tiempo que se toma el procedimiento, se han desarrollado métodos alternativos, como la extracción con sílice o con perlas magnéticas recubiertas de polímero, los cuales permiten trabajar con volúmenes pequeños y menor cantidad inicial de tejido calcificado, además de favorecer la automatización (**Barrio-Caballero**, 2013).

El método de extracción con perlas magnéticas se ofrece en un estuche para extracción de ADN (PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit) y su plataforma semi-automatizada (Automate Express™, Applied Biosystems®).

Este estuche usa perlas recubiertas de polímero, y los fabricantes sugieren usar entre 50 y 80 mg de polvo de hueso en un volumen máximo de digestión de 300 µL, con un tiempo de incubación a 56 °C durante 2 a 18 horas, seguido de la purificación (**Life Technologies Corporation**, 2010).

Aunque resulta atractivo pensar en utilizar estas cantidades mínimas de material inicial para obtener el ADN necesario para el estudio genético, en muchas ocasiones el estado de los restos no lo permite debido a la escasa cantidad y la gran degradación del material genético en estos tejidos; además, se ha demostrado que a partir de restos humanos esquelizados recuperados en zonas cercanas al ecuador, especialmente aquellas con altas temperaturas y humedad, normalmente se obtiene menos ADN por unidad de masa de polvo de hueso que en restos recuperados en las regiones de los trópicos (**Campos, et al.**, 2012), por lo cual es posible que no sea útil partir de cantidades como las sugeridas en el estuche mencionado.

La comparación de los métodos de purificación y digestión de ADN ha permitido determinar cuál es el más eficiente (**Uzair, et al.**, 2017; **Rothe & Nagy**, 2016); sin embargo, cada uno contempla protocolos diferentes de digestión o descalcificación. En el presente trabajo se propone un protocolo unificado para la digestión y descalcificación que permita usar cualquier metodología de purificación de ADN disponible en el laboratorio: la orgánica (fenol-cloroformo), con sílice o con perlas magnéticas, y que, además, facilite aumentar la cantidad del material pulverizado inicial sin alterar la calidad del ADN.

Materiales y métodos

Muestras. Se analizaron 675 muestras de material pulverizado provenientes de tejido calcificado de las que se procesan de manera rutinaria en el Laboratorio a partir de huesos compactos o esponjosos, fémur, porción petrosa del temporal y, en algunos casos, dientes. Se empleó el ADN de dos líneas celulares: 9947A y 2800M.

Estudios preliminares. Se realizó un estudio preliminar que evaluó siete ensayos (experimentos) con cuatro muestras por duplicado de casos llegados al Laboratorio, con el fin de probar la efectividad del PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit. En la Tabla 1 se presentan los ensayos y las condiciones en las que cada uno variaba. Las muestras fueron cuantificadas y tipificadas con los estuches rutinariamente empleados en el Laboratorio.

Digestión y descalcificación de tejido óseo. Con base en los experimentos previos en el Laboratorio, así como en reportes de la literatura (**Loreille, et al.**, 2007; **Amory, et al.**, 2012), se partió de 1 g de material pulverizado para evaluar la eficiencia de la digestión, se utilizó un volumen de 15 ml de solución tampón para digestión compuesto de EDTA (JT Baker), lauril sarcosinato de sodio (LSS) (Sigma-Aldrich) y 10mg/ml de proteinasa K (pK) (AG Scientific).

Se procesaron 42 muestras de material pulverizado provenientes de tejido calcificado: se tomó 1 g del material y se lo colocó en tubos de tipo Falcon; estos se pesaron

antes y después de añadir la solución tampón de digestión y, posteriormente, se incubaron a 56 °C con agitación por inversión total durante toda la noche. Finalizado este tiempo, se pesó el tubo con el producto digerido, y luego se centrifugó a 2.700 g durante 5 minutos a 20 °C; el sobrenadante se reservó y el remanente del material pulverizado se secó a 56 °C durante toda la noche; por último, se determinó el peso del remanente seco. El procedimiento anterior se aplicó en ocho tratamientos diferentes (Tabla 2). Los productos de digestión se concentraron usando la unidad de ultrafiltración Amicon de 100 KDa por poro de exclusión (Millipore).

Para evaluar la cantidad de ADN que podría “perderse” cuando la digestión no fuera completa, se tomó el remanente seco de seis muestras y se realizó un proceso de digestión (segunda digestión) con el tratamiento 5; posteriormente, se determinó la cantidad de ADN recuperado de esta segunda digestión, y se comparó con los datos de la cantidad de ADN de la primera digestión.

Efecto de la solución tampón y del tiempo de digestión.

Para valorar el efecto de la solución tampón y el tiempo de digestión sobre el ADN, se utilizó como control ADN de buena calidad con una concentración entre 3 y 4 ng/μL proveniente de las líneas celulares 9947A y 2800M, y

de ADN previamente extraído de una muestra de fémur; estas muestras se dejaron en contacto con el tratamiento 5 (EDTA 0,5 M; pH 8,0; LSS al 0,5 %, y 300 μL de pK) en tres periodos diferentes: seis horas, toda la noche (12 a 15 horas), y 24 horas, al cabo de los cuales se purificó el ADN usando el método con sílice (QIAquick de QIAGEN) y se evaluó la cantidad de ADN recuperado y la integridad en cada período. Las muestras se tipificaron para marcadores del tipo de microsatélites (STR) utilizando el Identifiler® Plus (Applied Biosystems®) según las recomendaciones del fabricante; la electroforesis capilar se realizó en el equipo 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), y con el programa Software Data Collection, Versión 3, en tanto que la asignación alélica se hizo con el programa GeneMapper ID-X, Versión 1.4.

Métodos de purificación del ADN. Las muestras del experimento anterior se sometieron a tres métodos de purificación o extracción de ADN: 1) extracción orgánica: la muestra se extrajo con un volumen de fenol saturado (Ambion), se centrifugó primero a 2.700 g y 20 °C durante 5 minutos, un volumen de fenol-cloroformo de 1:1, seguida de una segunda centrifugación a 2.700 g y 20 °C durante 5 minutos y, por último, un volumen de cloroformo (Merck),

Tabla 1. Análisis preliminares para la modificación del protocolo de extracción de ADN con el estuche PrepFiler™ BTA

Condiciones	Estudios preliminares						
	Experimentos						
	1	2	3	4	5	6	7
Polvo de hueso (mg)	50	150	600	500	500	500	500
Uso de columnas Microcon			X	X			
Solución tampón BTA (μL)	220	220	440	2200			
Proteinasas K (20 mg/ml) (μL)	7	7	14	70			
Ditiotreitol (μL)	3	3	6	30			
Uso de columnas Amicon de 100 KDa (50 ml)					X	X	X
EDTA 0.5 M pH 8.0 (ml)					14	14	14
Proteinasas K (10 mg/ml) (μL)					1000	1000	1000
Tween 20						X	
Dodecil sulfato de sodio (%)						1	
Lauril sarcosinato de sodio (%)					1		

Tabla 2. Tratamientos aplicados para evaluar las diferentes condiciones de digestión y descalcificación simultáneas

Condiciones	Tratamientos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
EDTA 0,5 M pH 8,0	X	X	X	X	X	X	X	X
Lauril sarcosinato de sodio al 1 %	X	X	X					X
Lauril sarcosinato de sodio al 0,5 %				X	X	X	X	
Proteinasas K (10mg/ml)	250 μL	300 μL	500 μL	250 μL	300 μL	500 μL		

y otra centrifugación a 2.700 g y 20 °C durante 5 minutos. Las muestras se concentraron y se lavaron en dispositivos de ultrafiltración de 100 KDa (Millipore); 2) extracción con columnas de sílice: se utilizó el QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y 3) extracción con perlas magnéticas: se utilizó el Prepfiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit y la unidad robótica Automate Express™ (Applied Biosystems®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Teniendo en cuenta que se conocía la cantidad de ADN presente en la solución inicial, se lo cuantificó después del proceso de purificación con cada uno de los métodos mencionados, y el valor obtenido se dividió por la cantidad inicial y se multiplicó por 100.

Modificación del método PrepFiler™. Se hizo la digestión de 20 muestras de polvo de hueso con el método del Prepfiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante (50 mg de material pulverizado); simultáneamente las muestras se digirieron usando el tratamiento 5 (0,5 M de EDTA; pH 8,0; LSS al 0,5 %, y 300 µL de pK), 1 g de material pulverizado y 15 ml de solución tampón para digestión. Dado que la purificación se llevó a cabo en la plataforma Automate Express™, fue necesario reducir el volumen de digestión a 250 µl (requerido por el sistema), con unidades de ultrafiltración Amicon de 100 KDa. Se cuantificó la cantidad de ADN con el estuche Quantifiler® Duo (Applied Biosystems®) y se evaluó el incremento en la cantidad de ADN dividiendo la concentración obtenida de 1 g de material pulverizado por la concentración obtenida de 50 mg; para los valores del ciclo umbral (CT) y del indeterminado (ND) se asignó un valor de 0,001 ng/µL, el cual estaba en el orden de magnitud de la sensibilidad del estuche.

Aplicación del protocolo unificado en muestras de casos analizados en el Laboratorio. Se analizaron los resultados de 605 muestras provenientes de los casos forenses del Laboratorio de los años 2015 y 2016. Estas muestras fueron tratadas siguiendo el protocolo unificado de digestión y descalcificación (0,5 M de EDTA de pH 8,0; 10 mg/ml de pK; 300 µL de LSS al 0,5 %), se les adicionaron 15 ml de solución tampón por cada gramo de polvo de hueso; se purificaron mediante el método de sílice (QIAquick), y se cuantificaron y tipificaron con los estuches usados de rutina en el Laboratorio; asimismo, se valoró la concentración del ADN recuperado y el número de marcadores genéticos reproducibles. Los resultados se agruparon según el número de sistemas amplificadas con éxito: positivo (mayor de 16), parcial (menor de 16) y negativo (sin perfil).

Para evaluar las mejoras en la recuperación de ADN con el protocolo unificado, se tomaron tres de las 605 muestras de los casos del Laboratorio, y se hizo un ensayo comparativo con cada muestra por duplicado: a) con el protocolo normal de purificación usando el estuche QIAquick (Qiagen), el ADN se eluyó con la solución tampón (volumen final de 40 µl); b) la elución se realizó pasando tres veces la misma

solución tampón por la misma columna (volumen final de 40 µl), y c) se hizo la elución tres veces con solución tampón nueva en cada ocasión, pero sobre la misma columna (volumen final de 120 µl).

Cuantificación. La cuantificación del ADN obtenido de los experimentos se llevó a cabo con los estuches Quantifiler® Duo y Quantifiler® Trío de la casa comercial Applied Biosystems, o con el Plexor® HY System de Promega. Se siguieron las recomendaciones del fabricante, y se utilizó el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®) y los programas de análisis HID Real-Time PCR Versión 1.2 y Plexor Forensics Versión 2. La concentración de ADN se expresó en ng/µl.

Tipificación. Las muestras se tipificaron para marcadores del tipo STR utilizando el estuche Identifiler Plus® (Applied Biosystems®) según las recomendaciones del fabricante; la electroforesis capilar se realizó en el 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), con el programa Data Collection Versión 3 y la asignación alélica se hizo con el programa GeneMapper™ ID-X Versión 1.4. En las muestras provenientes de los casos del laboratorio se utilizaron otros estuches para marcadores STR como el PowerPlex® 16 HS System, el PowerPlex® ESX17 System, el PowerPlex® ES17 System, y el PowerPlex® Fusion System de Promega Corporation, y el NGM Select de Applied Biosystems®.

Análisis estadístico. Los resultados se analizaron utilizando el programa Statistix 8.0. Se hizo un análisis de varianza de los tratamientos de digestión, los tiempos de digestión (pruebas de comparación de Kruskal Wallis, *Kruskal-Wallis-All-Pairwise Comparisons Tests*) y las alturas de los picos expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) de cada uno de los sistemas contra diferentes tiempos de digestión. Por último, se usó Excel 2010 para el análisis estadístico de las muestras de los casos forenses.

Resultados y discusión

Estudios preliminares. Los estudios preliminares se hicieron con el método de PrepFiler™ dado que planteaba ciertas ventajas frente a las otras dos metodologías de purificación de ADN, como la automatización, el menor tiempo del procedimiento, el manejo simultáneo de un número considerable de muestras, una menor cantidad de material pulverizado y, por lo tanto, un menor consumo de reactivos (**Applied Biosystems by Life Technologies**, 2012).

Sin embargo, el método mostró poca eficiencia en la recuperación de ADN en el tipo de muestras provenientes de los casos del Laboratorio. Las cantidades de ADN obtenidas mostraron fluctuaciones grandes, entre 0,02 y 0,007 ng/µl (no se muestran los datos), pero por lo general inferiores a la cantidad necesaria para alcanzar el umbral analítico validado en el Laboratorio, lo que repercutió en perfiles con pérdidas o ganancias alélicas y desequilibrios en heterocigotos. Las modificaciones propuestas del protocolo original, es decir, el aumento de la cantidad de material pulverizado y el empleo de dispositivos concentradores

antes y después de la digestión, resultaron en un aumento en la cantidad de ADN recuperado, corroborando así lo sugerido en estudios anteriores (Barrio-Caballero, 2013; Jakubowska, *et al.*, 2012; Davoren, *et al.*, 2007). Además, se encontró que cerca de 50 % del polvo de hueso quedaba sin digerir, probablemente por no haberse usado la cantidad de solución tampón necesaria. Es claro que la capacidad de esta para digerir totalmente el material pulverizado se vio reflejada en un aumento significativo de la cantidad de ADN recuperado. El cambio en la cantidad de la solución tampón de digestión permitió una lisis total del material pulverizado, lo que repercutió en una mayor recuperación del ADN (no se muestran los datos).

El cambio del detergente dificultó la concentración del ADN debido a la formación de grumos en la membrana del dispositivo Amicon de 100 KDa, posiblemente por efecto de la temperatura sobre el detergente en el momento de centrifugar las muestras. Sin el detergente se observaron resultados similares a los que se obtuvieron usando el LSS; sin embargo, en estudios posteriores se constató que en algunas muestras óseas, especialmente las de tipo esponjoso, se formaban componentes grasos que dificultaban la concentración en las columnas de Amicon de 100 KDa, y que desaparecían al usar el LSS, lo cual resultó en una mayor efectividad en la concentración y en el método en general.

Eficiencia de la digestión. A partir de los pesos determinados para evaluar la digestión (Tabla 1S, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/download/SuppFile/527/2404>) se calculó el porcentaje de digestión restando el peso del remanente del peso inicial. Los resultados del análisis de varianza indicaron que, aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos probados para digerir el tejido calcificado, el tratamiento 5 mostró un porcentaje mayor de digestión y una menor dispersión de los datos (Figura 1). El uso de esta mezcla representa un ahorro de 50 % en el consumo del detergente y de 70 % en el consumo de proteinasa K, comparada con el protocolo de la desmineralización completa (Loreille, *et al.*, 2007).

Asimismo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con pK (4 y 5) y los que no la incluyeron (7 y 8), con un valor crítico de comparación de 21.518 y un valor de significancia de 0,05.

Con los tratamientos 7 y 8 se observó una disminución del material pulverizado mayor de 40 %. Este resultado es interesante, dado que todos los protocolos de degradación de tejidos incluyen tanto proteasas como detergentes que digieren y solubilizan estructuras celulares y matrices de proteína (Edson, *et al.*, 2004; Sambrook, *et al.*, 1989), aunque es probable que en los restos humanos calcificados, las estructuras y moléculas orgánicas estén alteradas o disminuidas significativamente y, por esta razón, el ADN, o parte de él, se encuentre asociado a la hidroxiapatita por fuera de los remanentes celulares (Rohland & Hofreiter, 2007; Jakubowska, *et al.*, 2012), lo cual demostraría la importancia de los protocolos de desmineralización y digestión simultáneas.

A partir de la cantidad de ADN recuperada en la digestión inicial de 1 g de material pulverizado, se extrapoló la cantidad esperada de ADN al digerir el remanente seco (Tabla3) Cuando se determinó la cantidad de ADN del remanente no digerido, se encontró que solamente 30 % de la cantidad esperada pudo recuperarse con la repetición del proceso (segunda digestión). Por lo anterior, resulta poco útil hacer una segunda digestión sobre un remanente cuando se tiene material suficiente para realizar una nueva digestión a partir de 1g de material pulverizado, sobre todo cuando el consumo de reactivos es el mismo.

Efecto de la solución tampón y del tiempo de digestión sobre el ADN. En la Figura 2 se muestra la cantidad de ADN recuperado después de someterlo a la acción de la solución tampón para la digestión durante tres períodos: seis horas, toda la noche y 24 horas. Aunque no se determinó la diferencia entre la cantidad de ADN inicial y la recuperada después de la digestión y la purificación, sí se comparó la cantidad recuperada con los tres tratamientos y se encontró que no había diferencias estadísticamente significativas

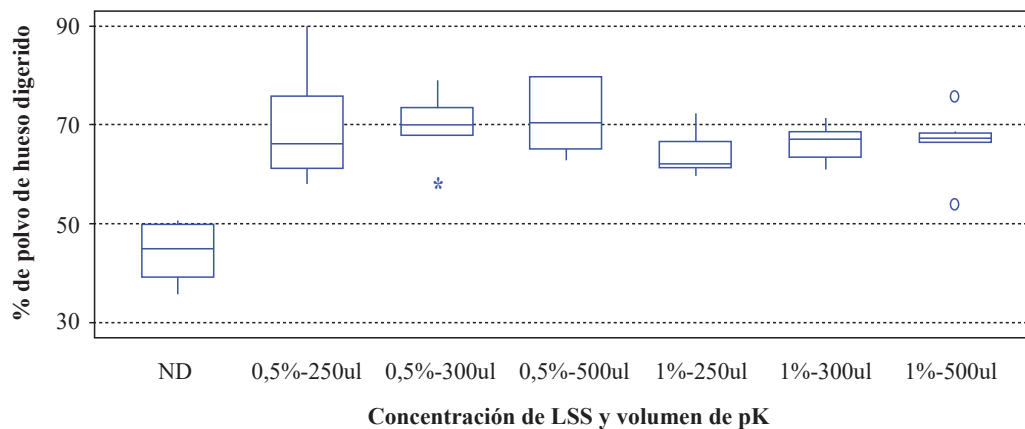
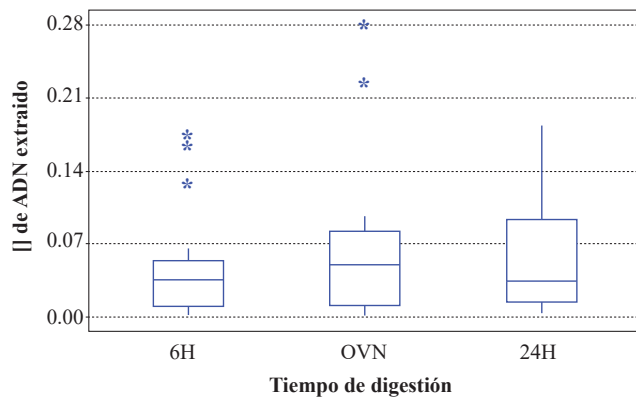


Figura 1. Eficiencia de la digestión. Tratamientos con lauril sarcosinato de sodio (LSS) y proteinasa K (pK). ND: LSS 0,5 %. LSS 0,5 % y 1 %; pK (10 mg/ml) 250, 300 y 500 μ L.

Tabla 3. Evaluación de pérdidas de ADN debido a material no digerido

Muestras	Concentración de ADN en ng/μL (digestión 1 gr)	Peso de remanente seco en gramos	Concentración de ADN (ng/μL) esperada del remanente seco	Recuperación observada (%)
R1	53,60	0,231	12,38	29,88
R2	65,44	0,414	27,09	19,12
R3	45,18	0,387	17,48	37,75
R4	62,31	0,194	12,09	30,47
R5	65,16	0,363	23,65	26,43
R6	76,17	0,324	24,68	26,81

**Figura 2.** Extracción de ADN después de la digestión con el protocolo unificado
Concentración de ADN (línea celular 9947A) obtenida después de la purificación para cada periodo de tiempo; OVN: overnight

entre ellos ($p=0,7463$). Es evidente la baja recuperación de ADN con los tres tratamientos, lo cual sería atribuible a pérdidas durante la purificación con las membranas de sílice.

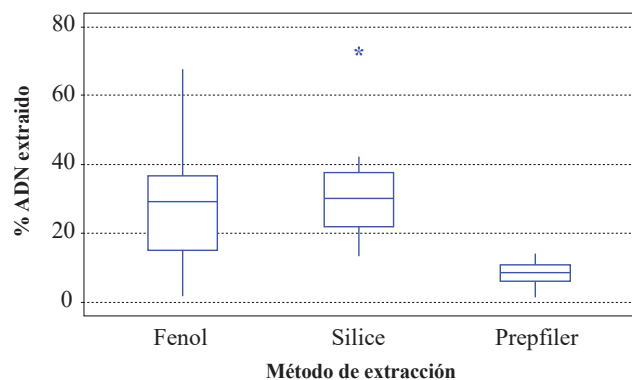
En la figura 1S, <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2398>, la figura 2S, <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2399> y en la figura 3S, <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2400>, se observa una variación en los niveles de fluorescencia entre tratamientos, principalmente en la muestra de fémur; este efecto puede deberse a la cantidad de ADN inicial tomada para la PCR de cada tratamiento, ya que los datos de cuantificación no se normalizaron. Asimismo, hay pérdida alélica en dos marcadores de la misma muestra, lo cual no puede atribuirse al tratamiento, ya que en las muestras de referencia (líneas celulares) estas pérdidas no se observaron.

Los resultados indican que la molécula conservó sus propiedades incluso después de 24 horas en la solución tampón de digestión, es decir que la composición de dicha solución, la temperatura de 56 °C y el tiempo, posibilitaron una digestión eficiente sin sacrificar la integridad del ADN y, además, se obtuvieron cantidades suficientes para lograr un perfil genético sin ganancia (*drop-in*) ni pérdida (*drop-out*) de alelos (Liu, *et al.*, 2012; Kitayama, *et al.*, 2010).

Métodos de purificación del ADN. En la Figura 3 se muestra la comparación de la cantidad de ADN recuperado usando tres métodos de purificación diferentes: el orgánico (fenol), el de sílice y el de perlas magnéticas (PrepFiler™); el resultado evidenció una mejor recuperación con el método de sílice (45,7 %), seguido de la extracción orgánica (39 %), lo cual concuerda con reportes previos (Loreille, *et al.*, 2007; Amory, *et al.*, 2012; Gamba, *et al.*, 2016; Uzair, *et al.*, 2017); se destaca que, aunque la recuperación de ADN fue menor usando el Automate Express™ BTA (16.3%), exhibió una menor dispersión de los datos, lo que sugiere que el método semiautomatizado es más homogéneo.

Modificación del método PrepFiler Express™ BTA.

En la Tabla 2S, <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2405>, se muestra la cantidad de ADN recuperada después de la extracción de 0,05 y 1 g de material pulverizado. Los resultados al aumentar la cantidad de material pulverizado a 1 g con el método de perlas magnéticas (PrepFiler™) y, en general para todos los métodos, fue similar al obtenido en los estudios preliminares, es decir, cuanto mayor la cantidad de material pulverizado mayor la del ADN recuperado, lo cual concuerda con otros reportes (Kitayama, *et al.*, 2010). Lo más valioso de este resultado radica en que el uso de un sistema de digestión diferente al sugerido por el PrepFiler Express™ BTA Kit del sistema Automate Express™, resultó igualmente funcional para la extracción de ADN y, además, hubo una digestión

**Figura 3.** Porcentaje de recuperación de ADN mediante tres métodos de extracción

completa en la mayoría de los casos, a diferencia del protocolo original, con el cual la digestión fue parcial en todos los casos.

Un micrométodo para la obtención de ADN como el PrepFiler Express™ BTA y la plataforma Automate Express™ es atractivo, pues las cantidades y volúmenes pequeños favorecen la manipulación, posibilitan la automatización y reducen la posibilidad de contaminación cruzada, como se ha propuesto para las extracciones de ADN con métodos basados en columnas de sílice y en perlas magnéticas (Life Technologies Corporation, 2010; Amory, *et al.*, 2012; Brevnov, *et al.*, 2009). Por esto, para muestras óseas en buen estado o para casos en que ha transcurrido poco tiempo desde el momento de la muerte, una poca cantidad de polvo de hueso permite obtener cantidades suficientes de ADN para la tipificación genética, pero cuando la muestra no está en buen estado se debe recurrir a mayores cantidades iniciales de material pulverizado.

Aplicación del protocolo unificado en muestras de los casos del Laboratorio. De las 605 muestras analizadas provenientes de los casos forenses del Laboratorio, 479 tuvieron resultado positivo; nueve, resultado parcial, y 117, negativo (Tabla 3S, <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2406>). El porcentaje de éxito total fue de 79 %; las piezas con mayor porcentaje de éxito fueron los huesos de manos y pies, como el metacarpo, el metatarso y las falanges, agrupadas en extremidades (EXT), con un 94,4 %, seguidas de las muestras de fémur (F), con 88 %, de tibia (T), con 86,6 %, de vértebras (V), con 84,4 % y, por último, las muestras de dientes (DD), con 46,9 % (Figura 4S, <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2401>).

Los resultados confirmaron que el uso del protocolo unificado para digestión y descalcificación de tejido permitió obtener ADN de calidad en cantidades suficientes para tipificar con éxito un gran número de muestras. A pesar de que el fémur aparece como una de las piezas más exitosas para la tipificación (Miloš, *et al.*, 2007), es importante resaltar que las condiciones en las que llegan las piezas son muy disímiles y puede ocurrir que otro tipo de piezas, por ejemplo los dientes o la porción petrosa del temporal, se prefieran al fémur (Kulstein, *et al.*, 2017). También se resalta que la solución tampón usada en el protocolo unificado fue

efectiva con huesos compactos, porosos e, incluso, con otro tipo de tejidos como el cartílago (este tipo de muestra no se incluyó en los experimentos, pero se ha venido empleando en los análisis preliminares de casos forenses debido a su alto contenido celular y, por ende, de ADN).

Por otra parte, al evaluar el protocolo unificado en cuanto al paso final de elución del ADN, se logró un aumento en la recuperación de ADN entre 23,85 y 36,14 % con el primer procedimiento y entre 29,92 y 35,58 % con el segundo, comparados con el método sugerido en el kit (Tabla 4). Esto indica que en la matriz de sílice quedó retenida una cantidad importante de ADN, la cual se perdería si se sigue el procedimiento recomendado. Aunque el empleo de la misma solución tampón para la elución permite obtener un ADN más concentrado, es más conveniente usar una nueva aumentando el volumen final y, eventualmente, diluyendo un poco el ADN para evitar que la molécula vuelva a unirse a la matriz de sílice. Para los casos del Laboratorio, esto constituye una herramienta útil para la recuperación de un ADN que ya de por sí es escaso.

Conclusiones

La plataforma Automate Express™ y el PrepFiler Express™ BTA Kit conforman un sistema funcional, práctico y eficiente para extraer ADN a partir de muestras óseas de buena calidad, especialmente por la semiautomatización; sin embargo, para los casos del Laboratorio, dado que la cantidad de ADN es escasa en la mayoría de las muestras, resulta más eficiente el método del sílice.

La solución tampón de digestión y las condiciones utilizadas resultaron funcionales para cualquiera de los tres métodos de extracción y purificación de ADN aplicados. En cualquier caso, la eficiencia en la digestión es primordial, y la cantidad de ADN que pueda recuperarse es directamente proporcional a la cantidad inicial de material que se digiere. Es preferible garantizar una digestión completa antes de usar el remanente en un nuevo proceso, por ejemplo, aumentando la cantidad de solución tampón para digestión hasta 20 ml por gramo de pulverizado.

La obtención de información genética a partir de restos humanos es un reto constante en el ámbito forense, ya que las muestras siempre están comprometidas; en un contexto como el de Colombia, en donde el número de víctimas es

Tabla 4. Concentración del ADN recuperado con modificaciones durante la elución del ADN extraído por el método de sílice (QIAquick Kit. Qiagen)

Muestras	Ensayo a	Ensayo b	Ensayo c	Porcentaje de recuperación en el ensayo b	Porcentaje de recuperación en el ensayo c
1	42,92	56,36	61,25	23,85	29,92
2	44,86	62,31	61,67	28,01	27,26
3	39,99	62,62	62,08	36,14	35,58

a) Concentración promedio de ADN (ng/μL) en condiciones de uso normal del estuche; b) Concentración promedio en (ng/μL) eluyendo tres veces el ADN con la misma solución tampón (volumen final de la solución tampón, 40 μL); c) Concentración promedio de ADN (ng/μL) eluyendo tres veces con la solución tampón (volumen final de 120 μL)

tan elevado, el tiempo transcurrido desde el momento de la muerte aumenta y la condición ambiental es tan adversa en la mayoría de las regiones, que es necesario contar con metodologías de trabajo que permitan optimizar la obtención de ADN; así mismo, su mejoría, por ejemplo, evaluando el pH del producto digerido y eventualmente modificándolo, permitiría incrementar la cantidad del ADN recuperado con los métodos de sílice y de perlas magnéticas (Dukes, *et al.*, 2012); por otra parte, el hecho de poder evaluar los efectos de la temperatura, el pH de los suelos de inhumación y el tiempo de exposición de los restos óseos, permitirá a los laboratorios tomar decisiones sobre qué metodologías usar dependiendo de las condiciones de las muestras.

Información suplementaria

Tabla 1S. Evaluación de la eficiencia de la digestión (lisis) del tejido calcificado, protocolo unificado. Vea la tabla 1S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2404>

Figura 1S. Amplificación ADN de la línea celular 9947A. Unidades relativas de fluorescencia (RFU) por marcador genético del ADN de la línea celular 9947A para cada periodo de digestión. Vea la figura 1S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2398>

Figura 2S. Amplificación del ADN de la línea celular 2800M. Unidades relativas de fluorescencia (RFU) por marcador genético del ADN de la línea celular 2800M para cada periodo de digestión. Vea la figura 2S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2399>

Figura 3S. Amplificación de ADN de la muestra de fémur. Unidades relativas de fluorescencia (RFU) por marcador genético del ADN de la muestra de fémur para cada periodo de digestión. Vea la figura 3S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2400>

Tabla 2S. ADN recuperado a partir de dos cantidades de material pulverizado de hueso digerido con el protocolo unificado. Vea la tabla 2S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2405>

Tabla 3S. Evaluación de resultados en muestras de los casos del Laboratorio con la aplicación del protocolo unificado. Vea la tabla 3S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2406>

Figura 4S. Porcentaje de éxito del protocolo unificado. Porcentaje de muestras con perfiles completos, parciales y negativos luego de su extracción con el protocolo unificado y posterior amplificación con los estuches comerciales disponibles en el laboratorio. Vea la figura 4S en: <https://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/527/2401>

Agradecimientos

Agradecemos a los peritos forenses Wilmer Arturo Cárdenas, por su aporte en el análisis estadístico y su participación en la etapa experimental, Constanza Forero Torres y Lady Espinosa Aroca, por su colaboración en el desarrollo experimental, y a los asistentes forenses Israel Moreno Pinzón y

Xiomara Puentes, por su participación en la fase preliminar de laboratorio; al doctor Manuel Hernando Paredes, por el aporte al diseño experimental, y a la doctora. Claudia Marcela Vargas, por la lectura crítica del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en torno al desarrollo de la investigación y que los reactivos y equipos usados son parte de los adquiridos por el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses para uso en los casos del Laboratorio de Investigación Genética de Restos Humanos de la Seccional Villavicencio.

Referencias

- Amory, S., Huel, R., Bilic, A., Loreille, O., Parsons, T. (2012). Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Science International Genetics*. **6**: 398-406.
- Applied Biosystems by Life Technologies. (2012). AutoMate Express™ Instrument.
- Barrio-Caballero, P. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*. **39** (2): 54-62.
- Bonewald, L. (2011). The Amazing Osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*. **26**: 229-238.
- Brevnov, M., Pawar, H., Mundt, J., Calandro, L., Furtado, M., Shewale, J. (2009). Developmental Validation of the PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit for Extraction of Genomic DNA from Biological Samples. *Forensic Science*. **54**: 3.
- Campos, P., Craig, O., Turner-Walker, G., Peacock, E., Gilbert, M. (2012). DNA in Ancient Bone – Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy*. **194**: 7-16.
- Collins, M., Nielsen-Marsh, C., Hiller, J., Smith, C., Roberts, J. (2002). The Survival of Organic Matter in Bone: A Review. *Archeometry*. **44**: 383-394.
- Davoren, J., Vanek, D., Crews, J., Huffine, E., Parsons, T. (2007). Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J*. **48**: 478-485.
- Dukes, M., Williams, A., Massey, C., Wojtkiewicz, P. (2012). Technical Note: Bone DNA Extraction and Purification Using Silica-Coated Paramagnetic Beads. *American Journal of Physical Anthropology*. **148** (3): 473-482.
- Edson, S., Ross, J., Coble, M., Parsons, T., Barritt, S. (2004). Naming the Dead Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. *Forensic Science*. **16**: 64-88.
- Frias, I., López-Soto, M., Prieto, V., Torres, Y. (2012). Identificación de ADN en Huesos y Piezas Dentales. Capítulo 2.2. Zaragoza.
- Gamba, C., Hanghøj, K., Gaunitz, C., Alfharan, A., Alquraishi, S., Bradley, D., Orlando, L. (2016). Comparing the performance of three ancient DNA extraction methods for high-throughput sequencing. *Molecular Ecology Resources*. **16**: 459-69.
- Gill, P., Ivanov, P., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*. **6**: 130-136.

- Higgins, D. & Austin, J.** (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science and Justice*. **53**: 433-441.
- Jakubowska, J., Maciejewska, A., Pawłowski, R.** (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *International Journal of Legal Medicine*. **126**: 173-178.
- Kitayama, T., Ogawa, Y., Fijii, K., Nakahara, H., Mizuno, N., Sekiguchi, K., Fukushima, H.** (2010). Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Legal Medicine*. **12**: 84-89.
- Kulstein, G., Hadrys, T., Wiegand, P.** (2017). As solid as a rock-comparison of CE- and MPS-based analyses of the petrosal bone as a source of DNA for forensic identification of challenging cranial bones. *International Journal Of Legal Medicine*. doi.org/10.1007/s00414-017-1653-z
- Life Technologies Corporation.** (2010). PrepFiler Express and PrepFiler Express BTA Forensic DNA Extraction Kits. User Guide.
- Liu, J., Zhong, C., Holt, A., Lagace, R., Harrold, M., Dixon, A., Hennessy, L.** (2012). AutoMate Express™ forensic DNA extraction system for the extraction of genomic DNA from biological samples. *Journal of Forensic Science*. **57**: 1022-30.
- Loreille, O., Diegoli, T., Irwin, J., Coble, M., Parsons, T.** (2007). High Efficiency DNA Extraction from Bone by Total Demineralization. *Forensic Science International Genetics*. **1**: 191-195.
- Miloš, A., Selmanović, A., Smajlović, L., Huel, R., Katzmarzyk, C., Rizvić, A., Parsons, T.** (2007). Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements. *Croat Medicine Journal*. **48**: 486-93.
- Montecinos, B. & Zeni, S.** (2009). Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. **43** (2): 177-193.
- Rohland, N. & Hofreiter, M.** (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*. **42**: 343-352.
- Rothe, J. & Nagy, M.** (2016). Comparison of two silica-based extraction methods for DNA isolation from bones. *Legal Medicine*: **22**: 36-41.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (Vol. 3). NY.
- Uzair, A., Rasool, N., Wasim, M.** (2017). Evaluation of different methods for DNA extraction from human burnt bones and the generation of genetic profiles for identification. *Medicine Science and the Law*. **57** (4): 159-166.
- Żołędzewska, M., Gronkiewics, S., Dobosz, T.** (2002). Comparison of Various Decalcifiers in Preparation of DNA From Human Rib Bones *Przegląd Antropologiczny. Anthropological Review*. **75**: 75-80.