

COMISIÓN INTERNACIONAL SOBRE PERSONAS DESAPARECIDAS

# Manual sobre Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos Humanos No Identificados

Programa de Capacitación y Mentoría  
en Identificación Humana  
con la Fiscalía General de la República





# Manual sobre Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos Humanos No Identificados

*Este Manual fue elaborado gracias al generoso apoyo del pueblo de Estados Unidos a través de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). El contenido es responsabilidad de la Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas (ICMP, por sus siglas en inglés) y no necesariamente refleja el punto de vista de USAID o del gobierno de los Estados Unidos.*





Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas

## **Programa de Capacitación y Mentoría en Identificación Humana con la Fiscalía General de la República**

**Manual sobre Métodos de Extracción de ADN  
de Restos Óseos Humanos No Identificados  
utilizados en el marco del Proyecto “Hacia una estrategia  
efectiva y sustentable de Identificación Forense para  
Personas Desaparecidas en México” desarrollado por la  
Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo  
Internacional (USAID) a través de su actividad  
“Promoviendo la Rendición de Cuentas por los Derechos  
Humanos” (RED-DH) e implementado entre julio de 2021 y  
agosto de 2022**

## **Título**

Programa de capacitación y mentoría en identificación humana con la Fiscalía General de la República. Manual sobre Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos Humanos No Identificados.

## **Autor**

Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas – ICMP, por sus siglas en inglés.  
Julio de 2022

## **Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas (ICMP)**

### **Dirección General**

Dra. Kathryn Bomberger, Directora General

### **Dirección Científica**

Dra. Mayra Eduardoff, Coordinadora de Ciencia y Tecnología y Jefa del Laboratorio de ADN  
Dr. Kieren Hill, Gerente del Laboratorio de ADN  
Virginia Hernandez de la Cruz, Oficial de Ciencia y Tecnología del Programa México

## **Centro Wim Kok para la Excelencia y el Aprendizaje (CEL)**

Andreas Kleiser, Gerente del CEL  
Emily Louise Hudson, Oficial del CEL

## **Programa de México**

Dra. Deborah Ruiz Verduzco, Jefa de Programa  
Carmen Osorno Solís, Coordinadora de Programa  
Sara Bonil Romero, Asistente de Programa

El presente manual busca apoyar el desarrollo de competencia de laboratorio, la validación, y uso por parte del laboratorio de genética forense con sede en la Ciudad de México (Sector Central), de la Dirección de Biología Molecular, de la Dirección General de Criminalística de la Coordinación General de Servicios Periciales (CGSP), en la Fiscalía General de la República (FGR) y su Agencia de Investigación Criminal (AIC), de dos métodos de extracción de ADN de restos óseos humanos: el Protocolo Estándar de Extracción Manual de ADN, y el Protocolo Dabney de Extracción de ADN. Esta herramienta fue preparada en el marco del Proyecto **“Hacia una estrategia efectiva y sustentable de Identificación Forense para Personas Desaparecidas en México”** que se desarrolla gracias a la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), a través de su actividad “Promoviendo la Rendición de Cuentas por los Derechos Humanos” (RED-DH). El proyecto inició en julio de 2021 y finalizará en agosto de 2022. Este manual ha sido distribuido a las y los participantes del curso sobre Métodos de Extracción de ADN de Restos Óseos Humanos no Identificados, que ICMP impartió -como parte del mencionado Proyecto- de forma virtual, en diciembre de 2021 y abril de 2022, a 47 peritas y peritos pertenecientes al laboratorio de genética forense de la FGR.

## Presentación

El problema de la identificación humana en México radica en la escala y magnitud del fenómeno, y en las técnicas utilizadas por los perpetradores para ocultar todo rastro de los cuerpos con el propósito de evitar su identificación o que el destino y paradero de la víctima sea establecido, eliminando la evidencia de lo ocurrido, lo que resulta en que, generalmente sean localizados restos óseos, de forma fragmentada y muy degradados. La identificación humana supone un enorme reto para las autoridades responsables. Es por ello que, para poder dar respuesta efectiva a las demandas de identificación por parte de familiares de personas desaparecidas, se requiere desplegar enfoques técnicos y científicos, especializados a las formas de desaparición.

La Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas (ICMP) utiliza técnicas avanzadas para identificar a personas que hayan desaparecido a raíz de conflictos armados, desastres naturales, eventos migratorios y otras circunstancias mediante el análisis genético. El análisis genético depende de manera central de la recolección de ADN por parte de las familias de las personas desaparecidas y de la extracción de ADN de los restos recuperados de víctimas no identificados. En lo que respecta a las víctimas, la extracción exitosa de ADN de sus restos es crítico para la identificación.

El ADN se puede extraer de una gran variedad de fuentes biológicas y existen numerosos y distintos métodos para extraer ADN exitosamente. En casos de personas desaparecidas, normalmente la fuente de origen son los restos óseos o los dientes. Dichos restos, debido a sus estructuras más densas, conservan el ADN durante más tiempo, pero eso no significa que dicho ADN sea más abundante en estas estructuras. Además, dicho ADN puede estar degradado debido a distintos factores como, la exposición a agentes químicos que dañan el ADN, o condiciones ambientales tales como el calor, el sol y el agua. Dicho contexto conlleva que la posibilidad de éxito en la extracción de ADN disminuya drásticamente, y por ello se requiere utilizar aquellos métodos que maximicen la cantidad de ADN que se puede obtener de cada muestra.

ICMP está especializada en la extracción de ADN de restos óseos humanos como huesos y dientes, y considera la aplicación de métodos de extracción genética especializados para restos óseos, una de las estrategias críticas para que los esfuerzos de identificación sean efectivos y sustentables. Con base en la experiencia de ICMP en el procesamiento de más de 50,000 restos óseos, que ha resultado en más de 20,000 identificaciones, es que se ha desarrollado el curso “Métodos de extracción de ADN de restos óseos humanos no identificados”. El mismo busca fortalecer las capacidades técnicas de las autoridades nacionales, en particular del Laboratorio Central de la Fiscalía General de la República (FGR) en la implementación de dos protocolos de extracción de ADN, que se consideran son los más óptimos para el tratamiento de restos óseos de personas fallecidas no identificadas.

Dichos métodos son 1) El Protocolo estándar de ICMP, el cual se denomina *Protocolo ICMP de desmineralización completa*, que se emplea normalmente cuando se cuenta con suficiente hueso o dientes, o su polvo; y 2) El *Protocolo adaptado de Dabney para la extracción de ADN de muestras de huesos y dientes muy antiguos* desarrollado inicialmente por Jesse Dabney y validado para uso forense por ICMP cuando existen limitaciones en la cantidad de material

disponible. Ambos protocolos se centran en el principio de que el ADN en el tejido óseo está contenido en las partes de calcio orgánico, e inorgánico del hueso o de los dientes, y, por lo tanto, el material óseo debe disolverse lo más completamente posible, en un tampón de lisis que favorecerá la desmineralización, a fin de liberar dicho material genético.

El manual que aquí se presenta, tiene el objetivo principal de proveer conocimientos e impulsar el desarrollo de habilidades técnicas para realizar un proceso preciso de desmineralización total de los restos óseos. Esta herramienta de aprendizaje permitirá a su vez, apoyar los procesos de validación e implementación de dichos protocolos en el Laboratorio de Genética Forense de la FGR.

Estamos convencidos que la aplicación de estos protocolos contribuirá al aumento del índice de éxito del análisis genético, en particular, a partir de muestras óseas altamente comprometidas. Este aumento, permitirá a su vez incrementar la capacidad de identificación de personas desaparecidas de la FGR.

ICMP agradece a la Fiscal Especializada en Materia de Derechos Humanos, Sara Irene Herrerías Guerra, al Titular de la Agencia Criminal de Investigación, Felipe de Jesús Gallo Gutiérrez y al Coordinador General de Servicios Periciales, David Zepeda Jones por su disposición y apertura para la implementación conjunta de este proyecto, y de manera especial a la Dra. Mavil López Casamichana, al Mtro. Miguel del Moral Stevenel, al Mtro. César Cuevas Melo, a la Perito Yadira Robles Ayala, a la Perito Merly Galicia Ramírez, al Perito Francisco Morales Cedillo, Perito Rocío Peralta Coria, y la Perito Fernanda Ostoa Pérez, por facilitar la realización del curso, y por los comentarios e insumos provistos para la construcción de esta versión del Manual sobre Métodos de Extracción de ADN.

ICMP se honra en colaborar con la FGR y de contribuir a los esfuerzos que realizan con profesionalismo, dedicación y responsabilidad. Esperamos que, el apoyo a la identificación humana sirva para fortalecer el estado de derecho, y para hacer efectivo el derecho a la verdad, la justicia, y la reparación de miles de familias de personas desaparecidas en México.

*Para ver el video de introducción del curso a cargo de la Dra. Mayra Eduardoff sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*

*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652486089>*



# Tabla de contenidos

<b>OBJETIVOS DE APRENDIZAJE</b>	<b>1</b>
<b>MÓDULO 1. EVOLUCIÓN Y TEORÍA DE LA EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>3</b>
1.1. Conceptos básicos de biología y genética del ADN	5
1.2. ADN y huesos	11
1.3. Principios básicos de la extracción de ADN de restos óseos	15
1.4. Breve repaso de la historia sobre los métodos de extracción de ADN	17
<b>MÓDULO 2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE RESTOS ÓSEOS Y DIENTES PARA SU POSTERIOR EXTRACCIÓN</b>	<b>21</b>
2.1. Introducción al estudio de las muestras procedentes de restos óseos y dientes.	23
2.2. Revisión de los procedimientos usados para el Lavado, secado y Pulverizado de los restos óseos y dientes.	28
<b>MÓDULO 3. PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP DE EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN</b>	<b>33</b>
3.1. Proceso manual de extracción de ADN por Desmineralización completa de Huesos y Dientes	36
3.2. Desmineralización del Hueso	41
<b>MÓDULO 4. PROTOCOLO AUTOMATIZADO DE EXTRACCIÓN DE ADN, MEDIANTE EL QIACUBE DE QIAGEN, POR DE DESMINERALIZACIÓN COMPLETA DE HUESOS Y DIENTES</b>	<b>67</b>
4.1. Preparación del equipo QIAcube para cargar las muestras:	69
<b>MÓDULO 5. PROTOCOLO DABNEY DE EXTRACCIÓN DE ADN, ADAPTADO POR ICMP</b>	<b>75</b>
5.1. Preparación del Buffer de extracción	78
5.2. Preparación del Buffer de unión	80
5.3. Preparación de las muestras y proceso de desmineralización	83
5.4. Unión del lisado al Buffer PB	85
5.5. Proceso de Purificación	90
5.6. Proceso de Elución	92
<b>MÓDULO 6. TUTORÍA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>95</b>
<b>RESPUESTAS A PREGUNTAS FRECUENTES</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>105</b>
<b>PERSONAS INSTRUCTORAS</b>	<b>109</b>
<b>LA COMISIÓN INTERNACIONAL SOBRE PERSONAS DESPARECIDAS</b>	<b>115</b>

## Tablas

TABLA 1: TIPOS DE TEJIDO ÓSEO .....	12
TABLA 2: ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LOS HUESOS .....	13
TABLA 3. PRIORIDAD DE MUESTRAS POST-MORTEM .....	26
TABLA 4: COMPONENTES DEL BUFFER DE EXTRACCIÓN POR MUESTRA.....	77
TABLA 5: COMPONENTES DEL BUFFER DE UNIÓN POR MUESTRA .....	78

## Figuras

### MÓDULO 1. EVOLUCIÓN Y TEORÍA DE LA EXTRACCIÓN DE ADN

IMAGEN 1: DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL DE UNA CÉLULA ANIMAL EUCARIOTA.....	5
IMAGEN 2: DIAGRAMA QUE DESCRIBE EL PLEGAMIENTO MOLECULAR .....	6
IMAGEN 3: EL CARIOTIPO HUMANO.....	7
IMAGEN 4: MAPA DE SECUENCIA DE ADN MITOCONDRIAL HUMANO .....	8
IMAGEN 5: ILUSTRACIÓN DE LA HERENCIA DEL ADN TANTO NUCLEAR Y MITOCONDRIAL.....	8
IMAGEN 6: ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ADN .....	9
IMAGEN 7: PARES DE BASES COMPLEMENTARIAS CONOCIDO COMO LA REGLA DE CHARGAFF .....	10
IMAGEN 8: ESTRUCTURA MACROSCÓPICA DE UN HUESO .....	12
IMAGEN 9: ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LOS HUESOS.....	13
IMAGEN 10: TASA DE ÉXITO EN LA GENERACIÓN DE UN PERFIL DE ADN.....	15
IMAGEN 11: LOS TRES PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN.....	16

### MÓDULO 3. PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP DE EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN

IMAGEN 12: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PREPARACIÓN SOLUCIÓN DE LEJÍA .....	37
IMAGEN 13: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PREPARACIÓN TAMPÓN DE DESMINERALIZACIÓN COMPLETA.....	39
IMAGEN 14: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROTEINASA K.....	40
IMAGEN 15: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 1.....	41
IMAGEN 16: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 2.....	42
IMAGEN 17: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 3.....	42
IMAGEN 18: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 4.....	42
IMAGEN 19: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 5.....	43
IMAGEN 20: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 6.....	43
IMAGEN 21: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 7.....	43
IMAGEN 22: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 9.....	44
IMAGEN 23: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 10.....	44
IMAGEN 24: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 11.....	45
IMAGEN 25: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 12.....	45
IMAGEN 26: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 14.....	45
IMAGEN 27: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 16.....	46
IMAGEN 28: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 17.....	46
IMAGEN 29: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 18.....	46
IMAGEN 30: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 19.....	47
IMAGEN 31: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 20.....	47
IMAGEN 32: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 21.....	47
IMAGEN 33: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 23.....	48
IMAGEN 34: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 25.....	48
IMAGEN 35: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 26.....	48
IMAGEN 36: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 27.....	49
IMAGEN 37: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE DIGESTIÓN, PASO 28.....	49
IMAGEN 38: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 1 .....	50
IMAGEN 39: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 2 .....	50
IMAGEN 40: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 3 .....	51

IMAGEN 41: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 5 .....	51
IMAGEN 42: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 6 .....	51
IMAGEN 43: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 7 .....	52
IMAGEN 44: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 8 Y 9.....	52
IMAGEN 45: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 10 .....	52
IMAGEN 46: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 11 .....	53
IMAGEN 47: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 12 Y 13....	53
IMAGEN 48: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 15 .....	54
IMAGEN 49: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 16 .....	54
IMAGEN 50: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP, PROCESO DE CONCENTRACIÓN DEL LISADO, PASO 20 .....	55
IMAGEN 51: ETAPA DE UNIÓN, COLUMNAS DE CENTRIFUGACIÓN QIAQUICK .....	56
IMAGEN 52: ETAPA DE UNIÓN, TUBOS 2ML .....	57
IMAGEN 53: ETAPA DE UNIÓN, PASO 1, TUBOS 2ML.....	57
IMAGEN 54: ETAPA DE UNIÓN, PASO 1, COLUMNAS QIAQUICK.....	57
IMAGEN 55: ETAPA DE UNIÓN, PASO 1, TUBOS 1.5M .....	57
IMAGEN 56: ETAPA DE UNIÓN, PASO 2, ORDEN DE LOS TUBOS .....	57
IMAGEN 57: ETAPA DE UNIÓN, PASO 3 .....	58
IMAGEN 58: ETAPA DE UNIÓN, PASO 4 .....	58
IMAGEN 59: ETAPA DE UNIÓN, PASO 5 .....	59
IMAGEN 60: ETAPA DE UNIÓN, PASO 7 .....	59
IMAGEN 61: ETAPA DE UNIÓN, PASO 8 .....	59
IMAGEN 62: ETAPA DE UNIÓN, PASO 10 Y 11.....	60
IMAGEN 63: ETAPA DE UNIÓN, PASO 12 Y 13.....	60
IMAGEN 64: ETAPA DE LAVADO, PASO 1 .....	61
IMAGEN 65: ETAPA DE LAVADO, PASO 4 .....	62
IMAGEN 66: ETAPA DE LAVADO, PASO 5 .....	62
IMAGEN 67: ETAPA DE LAVADO, PASO 6 .....	63
IMAGEN 68: ETAPA DE LAVADO, PASO 9 .....	63
IMAGEN 69: ETAPA DE ELUCIÓN, PASO 1 .....	64
IMAGEN 70: ETAPA DE ELUCIÓN, PASO 2 .....	64
IMAGEN 71: ETAPA DE ELUCIÓN, PASO 4 .....	65

#### **MÓDULO 4. PROTOCOLO AUTOMATIZADO DE EXTRACCIÓN DE ADN, MEDIANTE EL QIACUBE DE QIAGEN, POR DE DESMINERALIZACIÓN COMPLETA DE HUESOS Y DIENTES**

IMAGEN 72: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, EQUIPO .....	69
IMAGEN 73: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, EQUIPO DE RADIACIÓN UV .....	69
IMAGEN 74: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, MATERIAL A UTILIZAR.....	69
IMAGEN 75: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, TRANSFERENCIA DEL LISADO.....	70
IMAGEN 76: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, VERIFICACIÓN DEL PROCESO – WITNESSCHECK.....	70
IMAGEN 77: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, CENTRIFUGACIÓN.....	71
IMAGEN 78: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, PREPARACIÓN.....	71
IMAGEN 79: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, CARGA DE LOS ADAPTADORES DEL ROTOR.....	71
IMAGEN 80: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, ORDEN DE LAS COLUMNAS .....	72
IMAGEN 81: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, MUESTRAS .....	72
IMAGEN 82: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, INTERFAZ .....	72
IMAGEN 83: PROTOCOLO AUTOMATIZADO QIACUBE, COMPROBACIÓN TRANSFERENCIA DEL CONTENIDO ....	73

#### **MÓDULO 5. PROTOCOLO DABNEY DE EXTRACCIÓN DE ADN, ADAPTADO POR ICMP**

IMAGEN 84: DABNEY, PREPARACIÓN PROTEINASA K.....	79
IMAGEN 85: DABNEY, PREPARACIÓN TAMPÓN DE EXTRACCIÓN .....	79
IMAGEN 86: DABNEY, POLVO DE CLORHIDRATO DE GUANIDINA .....	80
IMAGEN 87: DABNEY, AGUA EN EL CLORHIDRATO DE GUANIDINA .....	80
IMAGEN 88: DABNEY, ISOPROPANOL .....	81
IMAGEN 89: DABNEY, TWEEN-20.....	81
IMAGEN 90: DABNEY, MEZCLA EN LA PLATAFORMA DE AGITACIÓN .....	81
IMAGEN 91: DABNEY, MUESTRAS DE POLVO DE HUESO .....	83

IMAGEN 92: DABNEY, MEZCLA POLVO DE HUESO CON EL BUFFER DE EXTRACCIÓN.....	84
IMAGEN 93: DABNEY, INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	84
IMAGEN 94: DABNEY, EMBALAJE PARA EL PROCESO DE PURIFICACIÓN.....	85
IMAGEN 95: DABNEY, SISTEMA UNIDO DENTRO DEL TUBO FALCON.....	86
IMAGEN 96: DABNEY, COLUMNA DEBIDAMENTE ROTULADA.....	86
IMAGEN 97: DABNEY, MARCAS ALREDEDOR DEL TUBO FLACON.....	86
IMAGEN 98: DABNEY, DIFERENTES COLORES DEL LISADO.....	87
IMAGEN 99: DABNEY, TRANFERENCIA DEL LISADO AL TUBO FALCON.....	87
IMAGEN 100: DABNEY, MUESTRAS INVERTIDAS.....	88
IMAGEN 101: DABNEY, MEZCLA DEL BUFFER DE UNIÓN.....	88
IMAGEN 102: DABNEY, CENTRIFUGACIÓN.....	89
IMAGEN 103: DABNEY, TRANSFERENCIA DEL LISADO.....	89
IMAGEN 104: DABNEY, DESEMBALAJE DEL SISTEMA.....	90
IMAGEN 105: DABNEY, PROCESO DE LAVADO DE LA MUESTRA.....	90
IMAGEN 106: DABNEY, TRANFERENCIA DE LAS COLUMNAS MINELUTE.....	91
IMAGEN 107: DABNEY, PROCESO DE ELUCIÓN.....	92
IMAGEN 108: DABNEY, VOLUMEN DEL ELUDIDO.....	92

# MANUAL SOBRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE RESTOS ÓSEOS HUMANOS NO IDENTIFICADOS

## Objetivos de aprendizaje

1. Explicar los principios de extracción de ADN: Lisis Celular y Purificación de ADN.
2. Identificar los diferentes reactivos necesarios, tanto para llevar a cabo el Protocolo de Extracción por desmineralización completa de ICMP, como el protocolo adaptado de Dabney por ICMP (Proteinasa K [Pro-K], Clorhidrato de Guanidina, Acetato de Sodio, Buffer de extracción, Buffer de unión PB, Buffer de lavado PE, etanol absoluto, Buffer de elución EB y su uso en cada paso).
3. Seguir los pasos para la realización de ambos protocolos.
4. Conocer los principios de purificación adicional mediante el uso de la plataforma robótica QIAcube.
5. Describir los principios para el buen manejo de la muestra y prevención de la contaminación.
6. Determinar la importancia de las comprobaciones (witnesscheck) llevadas a cabo por una persona distinta a la que está ejecutando el proceso, en cada una de las etapas en las que así se haya establecido previamente.



# **MÓDULO 1**

## **EVOLUCIÓN Y TEORÍA DE LA EXTRACCIÓN DE ADN**



# MÓDULO 1.

## Evolución y teoría de la extracción de ADN

### 1.1. Conceptos básicos de biología y genética del ADN

#### Conceptos básicos de biología celular

La célula animal es una célula eucariota caracterizada por la presencia de núcleo, membrana plasmática y citoplasma. En el interior del citoplasma se encuentran las otras estructuras de las células llamadas orgánulos.

Hay más de 10 billones (10.000.000.000.000) de células en el cuerpo humano. La gran mayoría de las células contienen ADN, pero hay algunas excepciones. Por ejemplo, los glóbulos rojos no tienen núcleo y, por lo tanto, no pueden contener ADN nuclear. Sin embargo, se puede obtener un perfil genético de la sangre, dado que los glóbulos blancos si contienen ADN. La siguiente ilustración muestra esta estructura típica, incluidos los orgánulos principales. Los dos orgánulos más importantes cuando se habla de ADN y extracción de ADN, son el núcleo y la mitocondria.

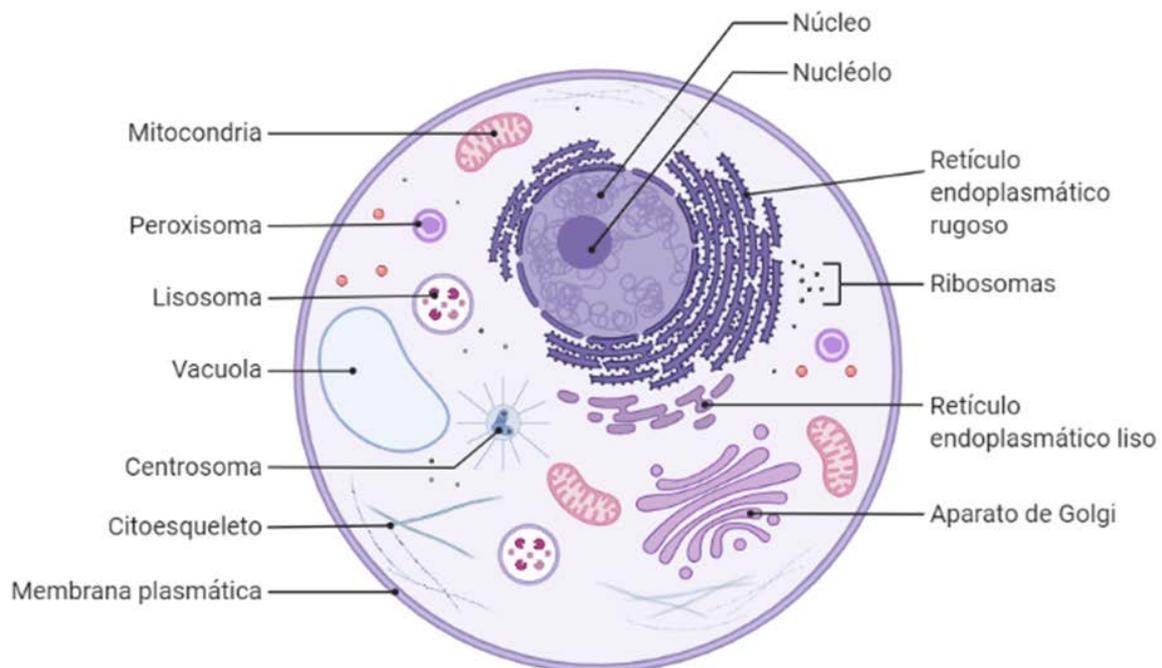


Imagen 1: Descripción estructural de una célula animal eucariota (BioRender)

## El núcleo y el ADN nuclear

El núcleo es un orgánulo altamente especializado que sirve como centro administrativo y de procesamiento de información de la célula. Este orgánulo tiene dos funciones principales:

- Almacenar el material hereditario de la célula, o ADN; y
- Coordinar las actividades de la célula, que incluyen el crecimiento, el metabolismo intermedio, la síntesis de proteínas y la reproducción (división celular).

Una membrana de doble capa, la envoltura nuclear, separa el contenido del núcleo del citoplasma celular. Dentro del núcleo de cada célula humana hay dos metros de ADN, que se divide en 46 moléculas individuales. Enrollar todo este material en un núcleo celular microscópico es una hazaña extraordinaria. Para que el ADN funcione, no se puede meter en el núcleo como una bola de hilo. En cambio, se combina con proteínas (histonas) y se organiza en una estructura compacta y precisa, una fibra densa en forma de cuerda llamada cromatina. La cromatina solo se organiza para formar cromosomas durante la mitosis o división celular.

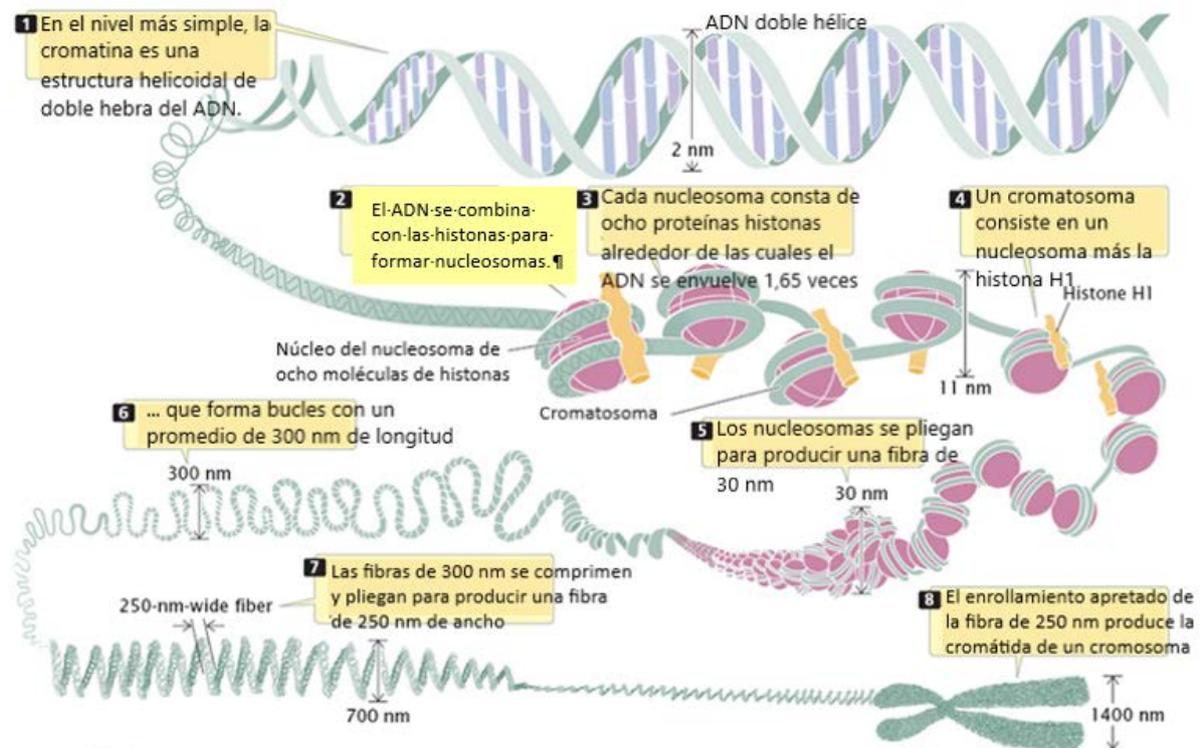


Imagen 2: Diagrama que describe el plegamiento molecular que se produce para permitir que se mantengan grandes volúmenes de datos genéticos en un espacio muy pequeño dentro del núcleo de una célula (BioRender)

## El Cariotipo humano

El cariotipo es el conjunto de cromosomas de un individuo. El ser humano tiene 46 cromosomas (23 pares), éstos y sus proteínas asociadas llevan la información hereditaria de una persona. El genoma haploide humano estándar contiene aproximadamente tres mil millones de pares de nucleótidos de ADN divididos entre 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (XX para mujeres, XY para hombres).

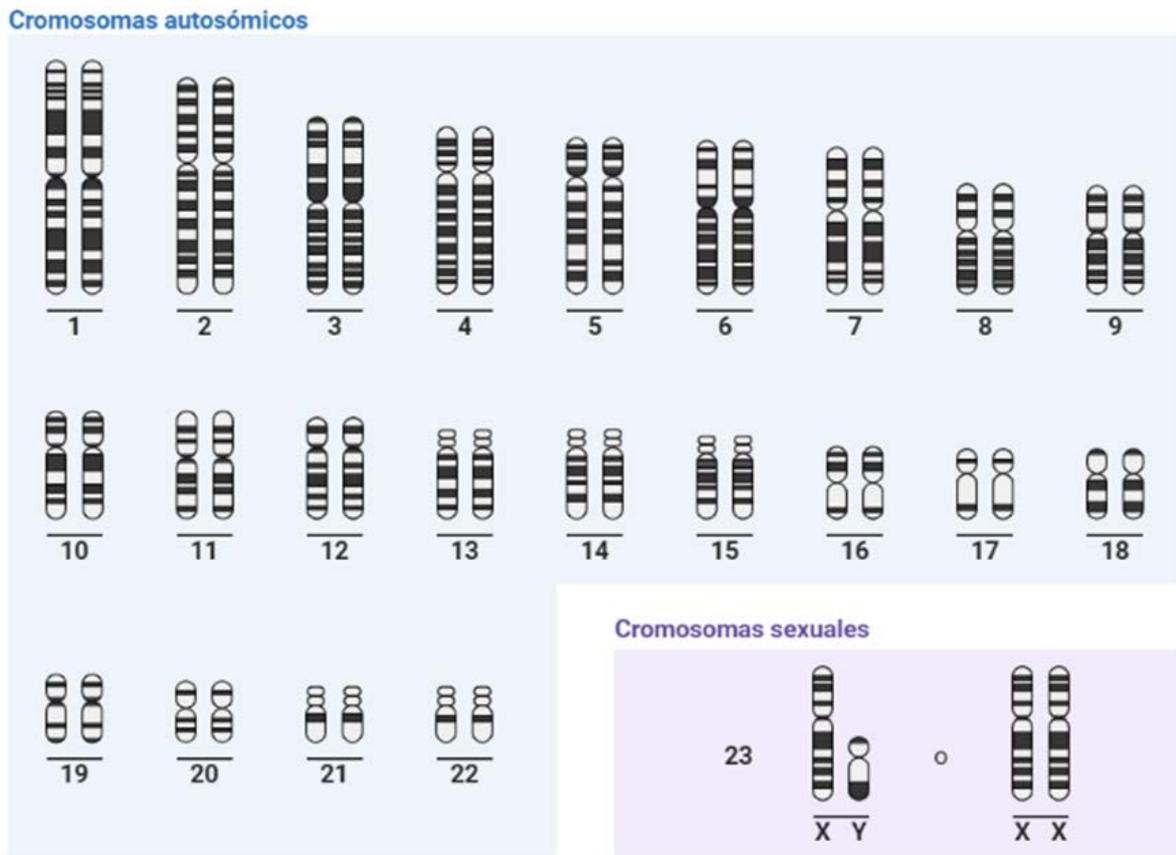


Imagen 3: El cariotipo humano, incluye 22 pares de cromosomas autosómicos y 1 par de cromosomas sexuales (BioRender)

## Mitocondrias y ADN mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos de forma oblonga que se encuentran en el citoplasma de cada célula eucariota. En la célula animal, son los principales generadores de energía, convirtiendo el oxígeno y los nutrientes en energía. La mitocondria es diferente de la mayoría de los otros orgánulos porque tiene su propio ADN circular, (similar al ADN de los procariontes, llamado ADN mitocondrial (ADNmt)) y se reproduce independientemente de la célula en la que se encuentra.

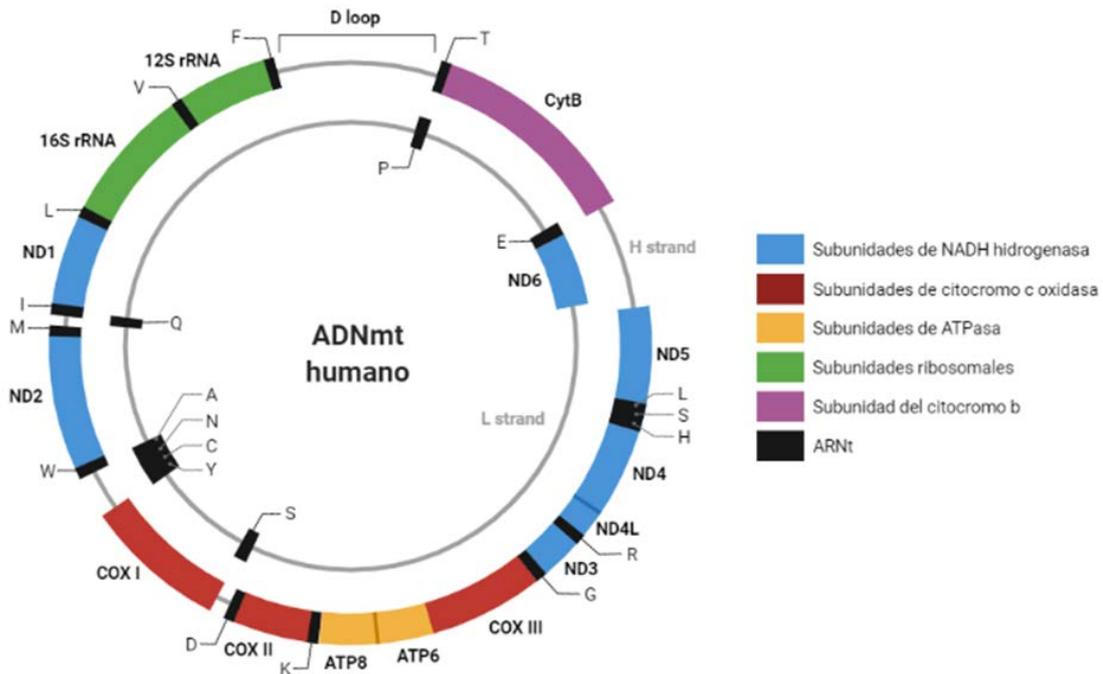


Imagen 4: Mapa de secuencia de ADN mitocondrial humano (BioRender)

En la mayoría de las especies animales, las mitocondrias parecen heredarse principalmente a través del linaje materno. Por lo general, un espermatozoide lleva mitocondrias en su cola como fuente de energía para su largo viaje hasta el óvulo. Cuando el espermatozoide se adhiere al óvulo durante la fecundación, la cola se pierde. En consecuencia, las únicas mitocondrias que suele tener el nuevo organismo, son las del óvulo. Por lo tanto, a diferencia del ADN nuclear, el ADN mitocondrial no se recombina en cada generación, por lo que se presume que cambia a un ritmo más lento.

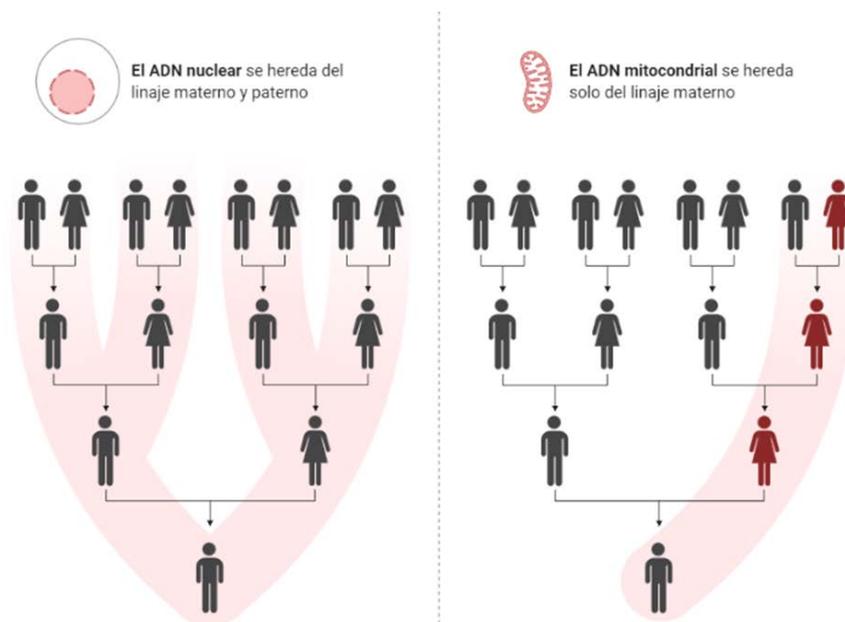


Imagen 5: Ilustración de la herencia del ADN tanto nuclear (izquierda) como mitocondrial (derecha) (BioRender)

## Estructura molecular del ADN

La estructura del ADN es una doble hélice formada por dos hebras de ADN enrolladas. Estas dos hebras son complementarias con cada hebra de ADN compuesta de subunidades llamadas nucleótidos, que están unidas covalentemente. Esta estructura se determinó en la década de 1950 a través del trabajo de Rosalind Franklin, en lo que se conoce como fotografía 51, quien usando la difracción de rayos X, consiguió dar la base teórica imprescindible para poder afirmar la condición de doble hélice de la molécula de ADN.

Cada uno de estos nucleótidos consta de tres partes:

- Grupo fosfato;
- Azúcar de cinco carbonos, o desoxirribosa, que junto con el grupo fosfato constituyen la "columna vertebral" de la estructura de doble hélice; y
- Base nitrogenada, ya sea con una estructura de anillo simple (pirimidina) o de anillo doble (purina).

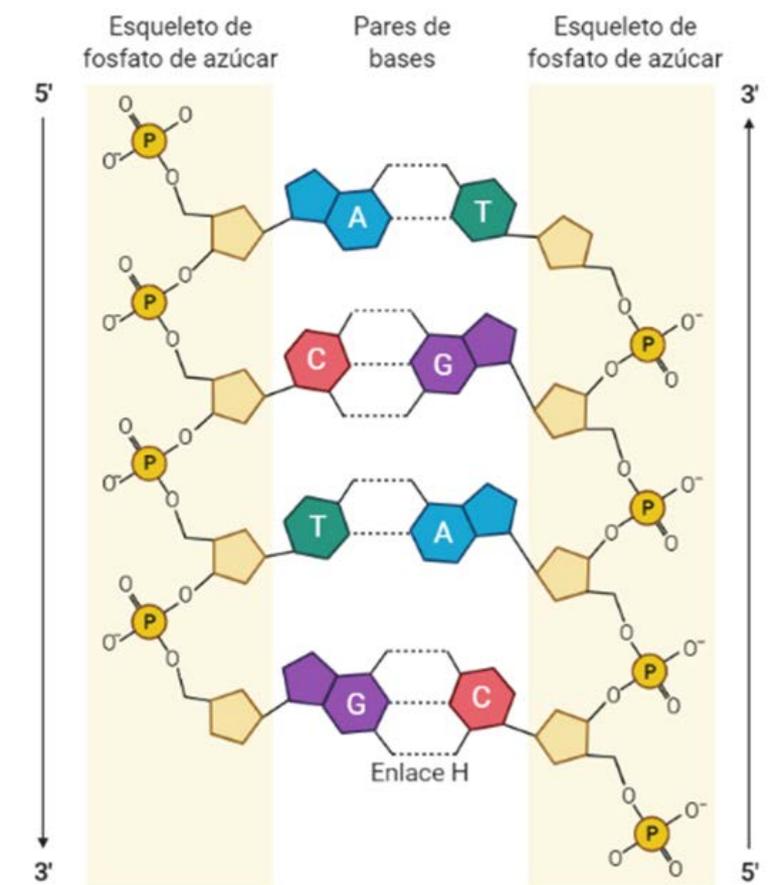


Imagen 6: Estructura molecular del ADN (BioRender)

Las bases nitrogenadas son cuatro:

- Adenina (A)
- Citosina (C)
- Guanina (G)
- Timina (T)

Siempre una **A**denina se enfrenta a una **T**imina y una **C**itosina se enfrenta a una **G**uanina en la doble cadena. Las bases enfrentadas se dice que son complementarias, de manera consistente, debido al impacto de la forma de las bases en la estructura helicoidal del ADN, y al número de posibles enlaces de hidrógeno que se pueden formar. Este emparejamiento de bases complementarias se conoce como **regla de Chargaff**:

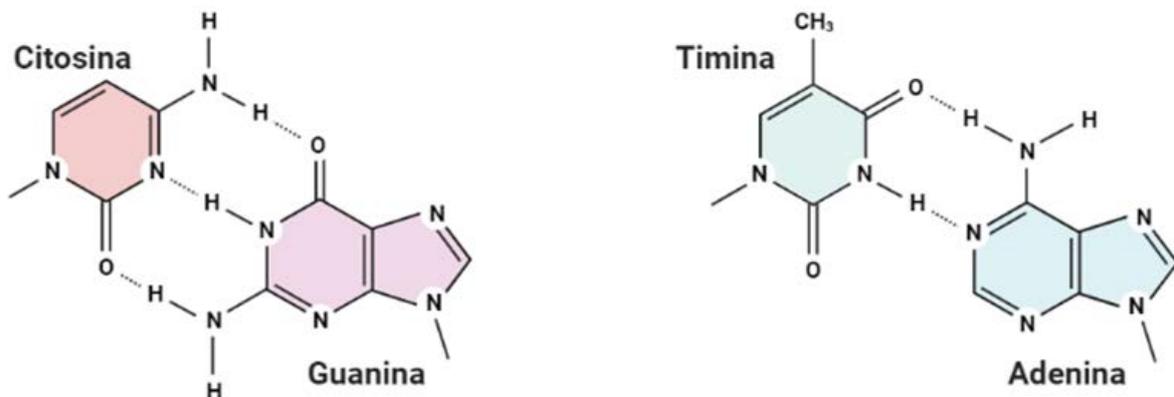


Imagen 7: Pares de bases complementarias conocido como la regla de Chargaff (BioRender)

Un extremo de un polímero de ADN contiene un **grupo hidroxilo** expuesto (es decir, un grupo -OH disponible para formar un nuevo enlace) en la desoxirribosa; esto se conoce como el extremo 3' de la molécula.

El otro extremo contiene un grupo fosfato expuesto; este es el final de 5'. La direccionalidad del ADN es de vital importancia para muchos procesos celulares, ya que las hélices dobles son necesariamente direccionales (una hebra que corre 5'-3' pares con una hebra complementaria que corre 3'-5'), y los procesos como la replicación del ADN ocurren en una sola dirección. Toda la síntesis de ácido nucleico en una célula ocurre en la dirección 5'-3', porque se agregan nuevos nucleótidos mediante una reacción de deshidratación en el grupo hidroxilo 3' expuesto.

## 1.2. ADN y huesos

Dado que las muestras post-mortem que se reciben para identificación son huesos, es importante entender la estructura ósea básica, así como la ubicación de ADN en su interior. En esta sección se verán los siguientes aspectos:

- Estructura macroscópica y microscópica del hueso;
- Ubicación de almacenamiento de ADN en un hueso;
- Desafíos que ocurren durante la extracción de ADN en muestras óseas.

### Estructura Macroscópica y Microscópica de los huesos

Los huesos son órganos rígidos que forman el endoesqueleto de un gran número de animales, incluidos los seres humanos. Un hueso es un tejido rígido que constituye parte del esqueleto en la mayoría de los animales vertebrados. Los huesos pueden tener variedad de formas y tamaños y tienen una estructura interna y externa compleja. Son livianos pero fuertes y duros, y cumplen múltiples funciones:

- Protección a los órganos vitales del cuerpo;
- Producción de células sanguíneas a través de la médula ósea (Hematopoyesis);
- Reserva de recursos (minerales, grasas);
- Soporte estructural;
- Permite el movimiento voluntario.

El tejido óseo, un tipo especializado de tejido conectivo firme, duro y resistente que está compuesto por células 2% de varios tipos (células osteoprogenitoras, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) y matriz extracelular 70 % compuesta por sustancia inorgánica rica en calcio y fósforo (hidroxiapatita) y en un 30 % por materia orgánica, principalmente fibras de colágeno. Los cristales de hidroxiapatita se disponen alrededor de las fibras de colágeno formando un armazón con excepcionales propiedades mecánicas, que le dan al hueso su gran resistencia.

En el interior de los huesos se encuentra la médula ósea, formada por tejidos blandos que incluyen el tejido hematopoyético, que produce las células de la sangre, y el tejido adiposo (grasa). Cuenta además con vasos sanguíneos y nervios que irrigan e inervan su estructura.

Existen dos tipos de tejido óseo que se diferencian macroscópicamente y microscópicamente:

- Hueso esponjoso o trabecular;
- Hueso compacto o cortical.

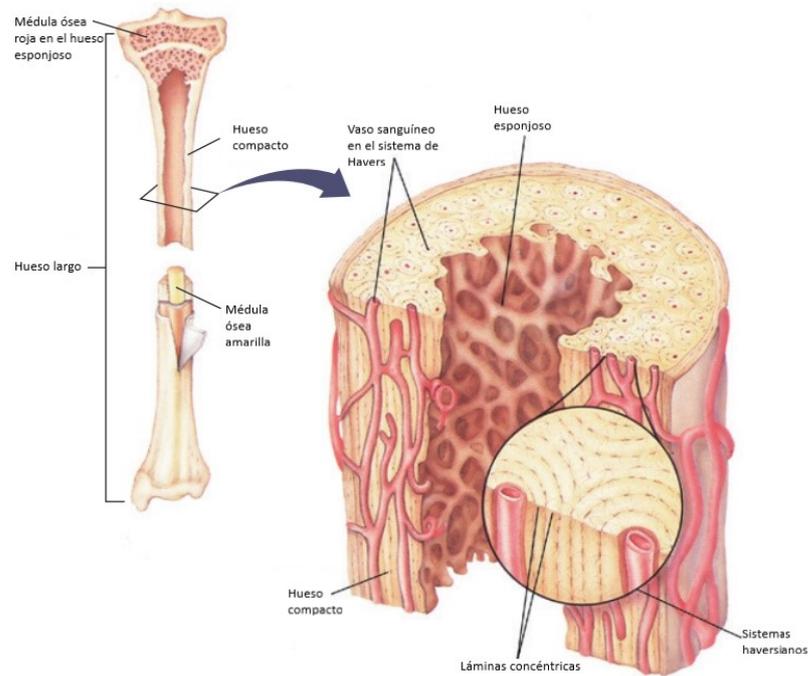


Imagen 8: Estructura macroscópica de un hueso (Farmacia 180)

Estas dos arquitecturas, cuya característica peculiar es la diferente densidad, pueden garantizar diferentes funciones, incluido el transporte de nutrientes, oxígeno y fluidos corporales.

	Hueso trabecular o esponjoso	Hueso compacto o cortical
Función	Proporcionar resistencia a la compresión.	Provee de resistencia a la tensión, compresión y torsión.
Características	<p>El hueso trabecular representa el 20% de la masa ósea total.</p> <p>El hueso trabecular se caracteriza por su alta porosidad - alrededor del 50% - 90% - lo que implica una mayor vascularización.</p> <p>Este tipo de arquitectura se encuentra comúnmente en la metáfisis de huesos largos, cubiertos por hueso cortical y en las vértebras.</p>	<p>Proporciona las características estructurales de los huesos largos (p. ej., fémur y tibia), huesos cortos (p. ej., muñeca y tobillo) y huesos planos (p. ej., bóveda del cráneo y huesos irregulares).</p>
Estructura	<p>Está formado por una estructura reticular de barras, placas y varillas de varios tamaños llamadas trabéculas.</p> <p>Tiene un componente orgánico de colágeno principalmente llamado oseína y un componente inorgánico de mineral óseo compuesto por diversas sales.</p>	<p>Constituye alrededor del 80% del esqueleto total.</p> <p>Es casi compacto, siendo solo un 10% poroso y, por lo tanto, tiene una menor concentración de vasos sanguíneos en comparación con el hueso trabecular.</p>

Tabla 1: Tipos de tejido óseo

## Estructura microscópica de los huesos

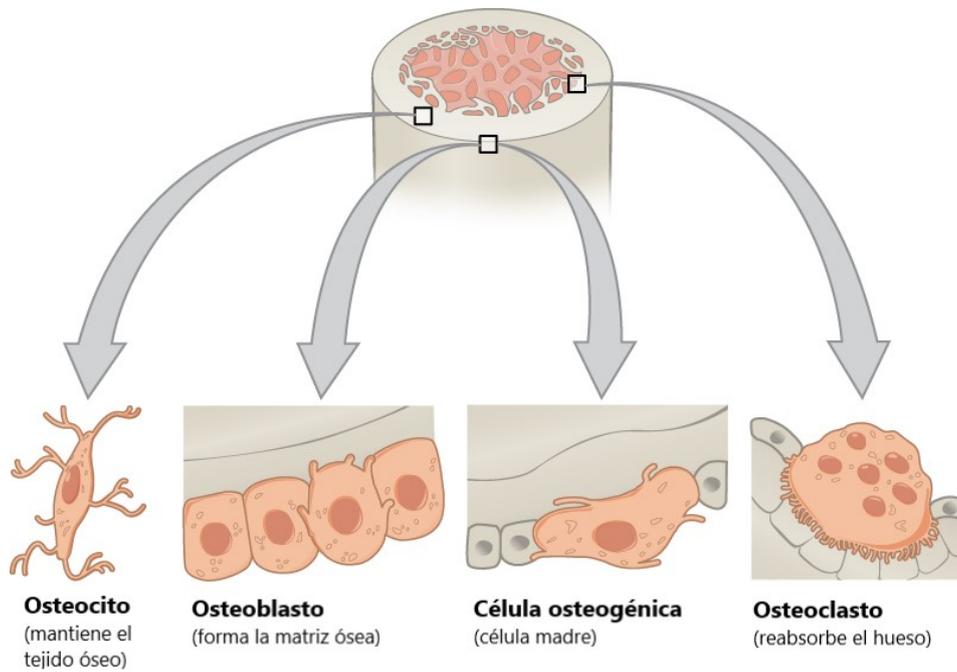


Imagen 9: Estructura microscópica de los huesos

Fuente: Openstax- Anatomía y Fisiología

Microscópicamente, el tejido óseo es un tejido metabólicamente activo compuesto por varios tipos de células. Estas células incluyen osteoblastos, osteoclastos y osteocitos.

<b>Osteoblastos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mononucleados, células de hueso inmaduras.</li> <li>• Responsables de la formación ósea: segregan osteoide, una mezcla de proteínas que posteriormente se mineraliza para convertirse en el sólido rígido portador de carga que es el mineral óseo.</li> <li>• Los osteoblastos también producen hormonas, como prostaglandinas o fosfatasa alcalina, una enzima que interviene en la mineralización de los huesos.</li> </ul>
<b>Osteoclastos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células multinucleadas ubicadas en las superficies óseas.</li> <li>• Responsable de la reabsorción ósea: el proceso de eliminar el tejido óseo disolviendo su matriz mineralizada y rompiendo el osteoide.</li> </ul>
<b>Osteocitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forma estrellada, células maduras de hueso.</li> <li>• Se originan a partir de osteoblastos que han migrado y quedan atrapados y rodeados por la matriz ósea que ellos mismos produjeron.</li> <li>• Aunque los osteocitos son células relativamente inertes, son capaces de síntesis y modificación molecular, así como de transmisión de señales a largas distancias, de forma similar al sistema nervioso.</li> </ul>

Tabla 2: Estructura microscópica de los huesos

## Almacén del ADN en los huesos

El ADN se almacena por completo en el hueso. Sin embargo, existen tres mecanismos principales de almacenamiento de ADN:

- Almacén de ADN en los osteocitos;
- Almacén de ADN unido a la fase mineral de los huesos esponjosos:
  - Componente inorgánico, llamado matriz mineralizada,
  - Componente orgánico, llamada Colágeno.

Los dos últimos mecanismos para la conservación del ADN en el hueso, es decir, la unión a (a) la matriz mineralizada y (b) el colágeno, tienen implicaciones importantes sobre cómo se extrae el ADN de manera más eficiente, considerando que la mayoría de los protocolos disponibles comercialmente implican la eliminación y descarte de esta fase mineral.

## Variaciones en la concentración de ADN dependiendo del tipo de hueso

Varios factores pueden jugar un papel muy importante en el éxito de la extracción de ADN a partir de restos óseos. A continuación, se enumeran algunas de ellas, para ilustrar la variación que puede ocurrir:

- Conservación y almacenamiento de huesos, tanto antes como después de la excavación;
- Ubicación de muestreo de huesos, tanto dentro de un hueso como dentro del cuerpo;
  - Dentro del hueso: está claro que una comprensión completa de la composición ósea es crucial para determinar la ubicación del ADN en el hueso y, por lo tanto, para seleccionar las muestras adecuadas;
  - Dentro del cuerpo: varios huesos del cuerpo tienen varias tasas de éxito en la generación de un perfil de ADN, como se ilustra en la Figura 10. Por lo tanto, es importante tener esto en cuenta al tomar una muestra de un cuerpo.
- Método de extracción: Como se mencionó en la sección anterior, la mayoría de los protocolos disponibles comercialmente implican la remoción y descarte de esta fase mineral y, por lo tanto, se pierde la eficiencia de la extracción de ADN. Además, no todos los protocolos incluirán una desmineralización completa del polvo óseo, lo que nuevamente resultará en una menor eficiencia de la extracción de ADN. Ambas deficiencias en los protocolos de extracción de ADN se abordan en el protocolo de extracción de ADN interno de ICMP.

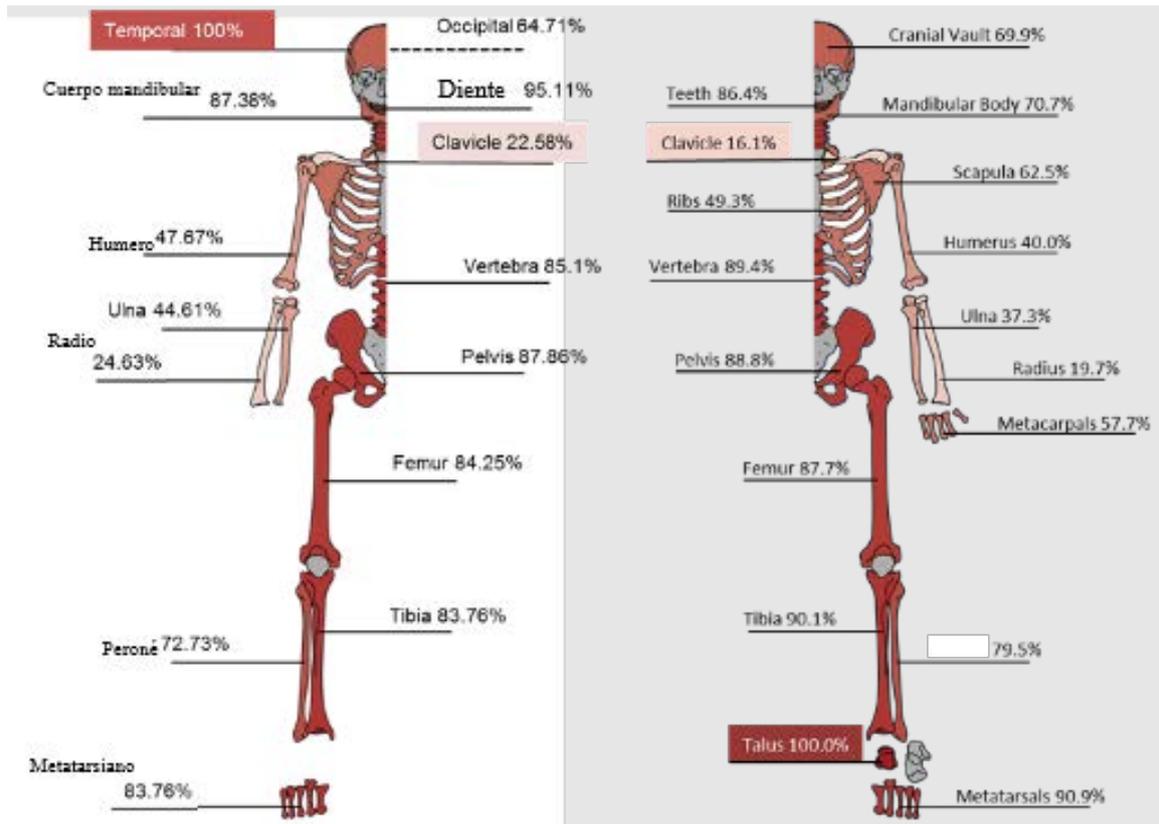


Imagen 10: Tasa de éxito en la generación de un perfil de ADN

Fuente: Alicehajic E. et al (2013) Perucac Lake, Bosnia: A Multidisciplinary Operation to Locate, Recover and Examine DNA Samples, and Identify the Missing From Balkans Conflicts

### 1.3. Principios básicos de la extracción de ADN de restos óseos

Una muestra biológica, como una muestra de hueso, contiene diversos elementos además del ADN. Las Histonas, proteínas asociadas al ADN que lo empaquetan y protegen en el interior del núcleo celular, pueden inhibir la capacidad de analizar el ADN. Por lo tanto, se han desarrollado métodos de extracción para:

- Separar proteínas y otros materiales celulares de las moléculas de ADN;
- Eliminar los inhibidores que reducen o impiden la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR);
- Producir una solución estable, que contenga ADN de alta calidad y que no se degrade con el tiempo durante el almacenamiento de la muestra.

Los objetivos del proceso de extracción de ADN suelen ser:

1. Lisar las células para liberar las moléculas de ADN. La lisis es la ruptura de la membrana de una célula, a menudo por mecanismos virales, enzimáticos u osmóticos que comprometen su integridad.

- Los lípidos de la membrana celular y del núcleo se descomponen con detergentes y tensioactivos;
- La descomposición de las proteínas se puede lograr agregando una proteasa (por ejemplo, proteinasa K).

Después de la lisis, el líquido obtenido, está formado por el contenido de las células lisadas y el Buffer de desmineralización, denominándose al producto obtenido, lisado.

2. Separar las moléculas de ADN de otro material celular. El lisado se trata con una solución salina concentrada para hacer que los desechos, como las proteínas y los lípidos, se agrupen. Además, los iones de Na<sup>+</sup> neutralizan las cargas negativas de las moléculas de ADN, lo que las hace más estables y menos solubles en agua.

3. Aislar o "purificar" el ADN para:

- Eliminar cualquier material no deseado restante y restos celulares;
- Contener el ADN dentro de soluciones, que favorezcan y permitan los pasos posteriores como la amplificación por PCR, generalmente agua.

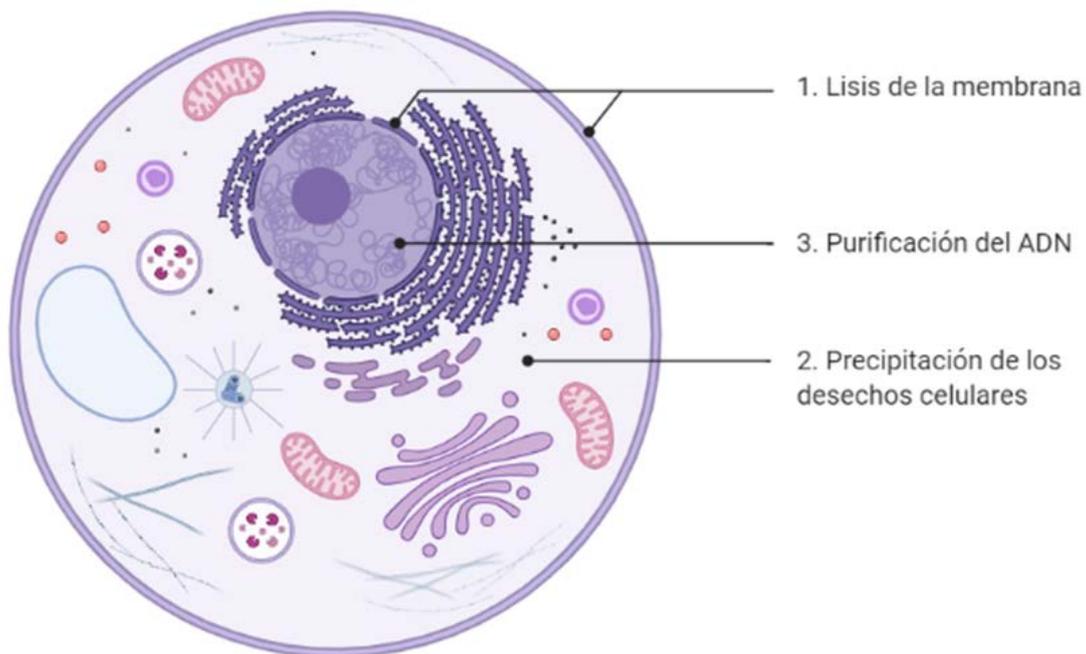


Imagen 11: Los tres principios básicos de la extracción de ADN (BioRender)

Todas las muestras deben manipularse con cuidado durante la extracción de ADN para evitar la contaminación cruzada, o la introducción de ADN exógeno.

El proceso de extracción es probablemente donde la muestra de ADN es más susceptible a la contaminación en el laboratorio que en cualquier otro momento del proceso de análisis de ADN forense. Por esta razón, el laboratorio de ICMP procesa los restos óseos de personas desaparecidas, en salas separadas, de donde se procesan las muestras de referencia.

ICMP recomienda dicha separación a todos los laboratorios que procesen muestras óseas.

## 1.4. Breve repaso de la historia sobre los métodos de extracción de ADN

### Técnicas primarias para la extracción de ADN

Existen varias técnicas primarias para la extracción de ADN, las cuales, son utilizadas por distintos laboratorios de ADN forense: extracción orgánica, extracción Chelex y extracción FTA o en fase sólida<sup>12</sup>. El procedimiento exacto de extracción o aislamiento del ADN varía según el tipo de evidencia biológica que se esté examinando. Por ejemplo, una muestra de sangre, de referencia, debe tratarse de manera diferente a un fragmento de hueso.

Para comprender el contexto en el que surgen estas técnicas, a continuación, se muestra un resumen de los principales acontecimientos y avances durante la era moderna de la genética<sup>3</sup>.

El primer intento de extracción de ADN fue realizado por el médico y biólogo suizo Johann Friedrich Miescher en 1869<sup>4</sup>. Miescher aisló el material celular y lo llamó "núcleos". Más tarde, su alumno lo llamó "ácido nucleico". Aunque desarrolló accidentalmente un método para el aislamiento de ácidos nucleicos, no estaba seguro de que lo que aisló fuera ADN.

En 1978, Vogelstein y Gillespie describieron la alta afinidad entre los silicatos y el ADN y el principio de unión selectiva del ADN cargado negativamente con la superficie de sílice que está cubierta con iones cargados positivamente<sup>5</sup>. Con el ADN firmemente unido a la matriz de sílice, el resto de los contaminantes celulares se pueden lavar antes de que el ADN extraído se eluya de las partículas de sílice utilizando agua destilada o un tampón como Tris-EDTA.

**La extracción orgánica**, a veces denominada extracción con fenol cloroformo, se ha utilizado durante un período de tiempo más prolongado y durante muchos años fue el método más utilizado para la extracción de ADN<sup>6</sup>. En principio, el reactivo de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCIA) se agrega después de la lisis de la célula. El fenol desnaturaliza las proteínas de manera eficiente. El alcohol isoamílico evita la emulsificación y, por tanto, facilita la precipitación del ADN. La emulsión se separa en dos fases tras la centrifugación: la fase acuosa superior compuesta de ADN disuelto en agua y la fase orgánica inferior que contiene disolventes orgánicos y componentes celulares hidrófobos que incluyen proteínas. Luego, la porción acuosa se transfiere a un tubo nuevo con el uso de una pipeta, y la fase orgánica se puede descartar.

Introducido a la comunidad forense en 1991, el **método de extracción Chelex** es una resina

---

<sup>1</sup> J. E. Stray, J. Y. Liu, M. G. Brevnov and J. G. Shewale, "Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping.," *Forensic Science Review*, vol. 22, pp. 169-175, 2010.

<sup>2</sup> J. E. S. J. G. Stray, "Extraction of DNA from human remains.," *Forensic Science Review*, vol. 22, pp. 177-185, 2010.

<sup>3</sup> J. M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Elsevier, 2011.

<sup>4</sup> R. Dahm, "Friedrich Miescher and the discovery of DNA," *Developmental Biology*, pp. 274-288, 2005.

<sup>5</sup> B. G. D. Vogelstein and D. Gillespie, "Preparative and analytical purification of DNA from agarose," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978.

<sup>6</sup> C. T. Comey, B. W. Koons, K. W. Presley, J. B. Smerick, C. A. Sobieralski, D. M. Stanley and S. F. Baechtel, "DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis.," *Journal of Forensic Sciences*, vol. 39, pp. 1254-1269, 1994.

de intercambio iónico que se agrega como suspensión a las muestras<sup>7</sup>. Los materiales celulares se unen a las perlas de Chelex, mientras que el ADN está disponible en el sobrenadante.

Otro enfoque para la extracción de ADN implica el uso de **papel FTA**. A finales de la década de 1980, Lee Burgoyne de la Universidad Flinders en Australia desarrolló el papel FTA como método para el almacenamiento de ADN<sup>8</sup>. El papel FTA es un papel absorbente a base de celulosa que contiene cuatro sustancias químicas para proteger el ADN de la degradación de nucleasas y preservan el papel del crecimiento bacteriano<sup>9</sup>. Como resultado, el ADN en papel FTA es estable a temperatura ambiente durante un período de varios años. En 2000, Whatman introdujo el uso de tarjetas Whatman FTA para fines de extracción de ADN. En resumen, estas tarjetas están impregnadas de tampones, detergentes y agentes quelantes que facilitan la extracción de ADN. A continuación, se extraen aproximadamente 1-2 mm del área de la muestra utilizando un "microperforador" esterilizado. Antes de que pueda procesarse para otras aplicaciones posteriores, el punzón se lava con detergente y se enjuaga<sup>1011</sup>.

El año 1998 marca cuando se introduce la **purificación y el aislamiento del ADN mediante partículas magnéticas** (Hawkins et al)<sup>12</sup>. Pueden emplearse nanopartículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo o polímero de unión a ADN con afinidad específica por el ADN para unir ADN a su superficie. La separación de las perlas magnéticas unidas al ADN del lisado celular se puede lograr aplicando un campo magnético en la parte inferior del tubo utilizando un imán externo. Con las perlas agregadas en el fondo del tubo, el sobrenadante se puede enjuagar.

Dado que la tasa de éxito en la extracción de ADN es esencial para la identificación humana en casos de personas desaparecidas, la búsqueda para obtener un método que llevara a una tasa de mayor éxito en la recuperación de ADN a partir de restos óseos, condujo al desarrollo de los distintos métodos que a continuación se enumeran, y que son el eje vertebrador de este manual, estos son los procedimientos basados en el **proceso de desmineralización**. La ventaja de estos métodos, es que simultanean la desmineralización y la digestión, ello hace que, al no descartarse el agente quelante, no se corre el riesgo de perder parte del ADN que está asociado a la matriz mineralizada, es decir adherido a la hidroxiapatita.

---

<sup>7</sup> P. S. Walsh, D. Metzger and R. Higuchi, "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.," *BioTechniques*, vol. 10, pp. 506-513, 1991.

<sup>8</sup> L. Burgoyne, "Safe collection, storage and analysis of DNA from blood", Promega, *Proceedings of the fifth international symposium on human identification*, 1994, p. 163.

<sup>9</sup> L. Burgoyne, "Solid medium and method for DNA storage". *United States of America Patent* 5, pp. 496-562, 1996.

<sup>10</sup>J. Lorente, L. J. Martinez-Gonzalez, F. Fernandez-Rosado, E. Martinez-Espin, C. Alvarez, C. Entrala, M. Lorente and E. Villanueva, "Recovering biological samples from crime scene using FTA paper.," *Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences*, vol. X, p. 103, 2004.

<sup>11</sup> L. C. Tack, M. Thomas and K. Reich, "Automated forensic DNA purification optimized for FTA card punches and Identifier STR-based PCR analysis.," *Clinical Laboratory Medicine*, vol. 27, pp. 183-191, 2007.

<sup>12</sup> T. Hawkins, "DNA purification and isolation using magnetic particles." *United States of America Patent* 5,705,628, 6 1 1998.

## Desarrollos posteriores hacia los métodos de extracción en el contexto forense y para identificación humana

**2007:** Loreille *et al* publican investigación sobre el proceso de desmineralización completa del hueso que demuestra el aumento de la eficiencia de extracción de ADN de muestras de hueso<sup>13</sup>. La mayoría de los protocolos de extracción de hueso utilizados en la comunidad forense hasta la fecha implicaban la eliminación de grandes cantidades de polvo de hueso sin disolver. El Protocolo de Loreille et al. desarrolló un método para lograr la desmineralización completa del hueso, lo que resultó en la disolución física completa de la muestra de hueso.

**2012:** Amory *et al* – Un equipo de peritos de la Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas adaptaron el protocolo de Loreille para la plataforma robótica de QIAcube logrando la automatización del proceso de desmineralización completa.<sup>14</sup> El rendimiento de este protocolo de desmineralización completa automatizado es similar al de la versión manual, pero aumenta de manera considerable el rendimiento del laboratorio.

A través de la aplicación del método de desmineralización completa manual y automatizado, la Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas procesó más de 52.000 muestras post mortem, incluyendo piezas altamente fragmentadas y degradadas, logrando la identificación de más de 23.000 personas desaparecidas.

**2013:** En el contexto de estudio de ADN antiguo, Dabney *et al* desarrollan un protocolo de desmineralización basado en sílice permitiendo la extracción eficiente de ADN antiguo, que es ADN particularmente degradado<sup>15</sup>.

**2018:** Rohland *et al* hacen una revisión del protocolo de Dabney de 2013, con la opción de usar perlas magnéticas recubiertas de sílice para automatización y modificaciones al buffer de ligar, que permite la recuperación de fragmentos de ADN cortos ( $\geq 35$  pb) acortos ( $\geq 25$  pb)<sup>16</sup>.

**2021:** En 2021, Xavier, Eduardoff *et al*, validan el protocolo Dabney para uso forense.<sup>17</sup>

---

<sup>13</sup>O. M. Loreille, T. M. Diegoli, J. A. Irwin, M. D. Coble and T. J. Parsons, "High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization.," *Science Direct*, pp. 191-195, 2007.

<sup>14</sup>S. Amory, R. Huel, A. Bilic, O. Loreille and T. J. Parsons, "Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains," *Forensic Science International: Genetics*, 2012.

<sup>15</sup> J. Dabney, M. Knapp, I. Glocke, M.-T. Gansauge, A. Weihmann and B. Nickel, "Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, pp. 15758-15763, 2013.

<sup>16</sup> N. Rohland, I. Glocke, A. Aximu-Petri and M. Meyer, "Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing.," *Nature Protocols*, pp. 2447-2461, 2018.

<sup>17</sup> Xavier C., Eduardoff M., Bertoglio B., Amory C., Xavier C., Casas-Vargas A., Pallua J., Parson W., "Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age" MPDI Genes, 2021.



# **MÓDULO 2**

**PREPARACIÓN DE LAS  
MUESTRAS PROCEDENTES DE  
RESTOS ÓSEOS Y DIENTES  
PARA SU POSTERIOR  
EXTRACCIÓN**



## MÓDULO 2.

### Preparación de las muestras procedentes de restos óseos y dientes para su posterior extracción

#### 2.1. Introducción al estudio de las muestras procedentes de restos óseos y dientes.

En el momento en el que un organismo muere, comienzan los procesos de degradación de sus biomoléculas, entre ellas el ADN. Los agentes causantes de esa degradación serán, las propias enzimas del organismo (autólisis), la posterior invasión de los restos por bacterias, hongos e insectos, y, finalmente, procesos químicos, principalmente hidrólisis y oxidación, que completarán la degradación del material genético<sup>1819</sup>.

Todos estos procesos llevarán tanto a la fragmentación del ADN (procesos de hidrólisis)<sup>20</sup>, como a la modificación del mismo (daño oxidativo).

La velocidad y el grado de descomposición del material genético de un resto va a depender de diversos factores endógenos y exógenos. El éxito en la obtención de información genética a partir de estructuras óseas está condicionado, aparte de por el tipo de estructuras, por las condiciones del enterramiento.

Las características del ambiente en el que se encuentra depositado un resto pueden ralentizar o incluso detener el proceso de degradación. Así las condiciones que más afectarán a la degradación del ADN serán la temperatura, la humedad, el pH o la presencia de ciertos compuestos en el suelo:

- La temperatura es el factor que más condiciona la preservación del material genético. Las temperaturas bajas durante el periodo de deposición de un resto favorecen su conservación óptima, debido a que, a bajas temperaturas, se produce una ralentización de las reacciones químicas responsables de la degradación orgánica. En el lado opuesto, la presencia de elevadas temperaturas puede favorecer la deshidratación parcial del ADN, deteniendo los procesos de hidrólisis.
- La humedad ejerce un efecto adverso sobre la preservación del material. Debido a la porosidad propia del hueso y a la acción disolvente de la humedad, se favorece la penetración de las sustancias orgánicas del sedimento en el interior del resto óseo. Esto incrementa la posibilidad de que el extracto de ADN presente moléculas

<sup>18</sup>W. Bar, A. Kratzer, et al. 1988. Postmortem stability of DNA. *Forensic Sciences International*, 39: 59-70.

<sup>19</sup> T.J. Parson "The Armed Forces DNA Identification Laboratory," *The Armed Forces Institute of Pathology*, 1994

<sup>20</sup> S. Pääbo, R.G. Higuchi y A. Wilson "Ancient DNA and the polymerase chain reaction," *Journal of Biological Chemistry* 264: 9709-9712, 1989. Y E. Golenberg, "DNA from plant compression fossils. in: ancient DNA," in B. Shapiro, et al, *Ancient DNA*, Springer-Verlag. New York, 1994; y N. Tuross, "The biochemistry of ancient DNA in bone," *Experientia*, vol. 50: 530-535, 1994.

inhibidoras, además de favorecer la degradación hidrolítica y oxidativa.

- Un pH neutro o ligeramente alcalino en el enterramiento favorece la preservación del ADN, Sin embargo, una disminución paulatina del pH provoca la degradación de la hidroxiapatita de los huesos o dientes.
- Los compuestos del suelo<sup>21</sup>. Se ha apuntado la posibilidad de que ciertos compuestos minerales del suelo, como la Montmorillonita, la caolinita, el feldespato o el cuarzo, podrían asociarse al ADN protegiéndolo frente a la acción de las endonucleasas. También se ha documentado la posibilidad de que la unión del ADN con ácidos húmicos del suelo causaría el mismo efecto protector, ya que inhiben la acción de enzimas biológicas. Sin embargo, otros componentes propios del suelo pueden ejercer el efecto contrario.

Las cuatro dificultades fundamentales a las que debe enfrentarse cualquier laboratorio cuando pretende la obtención de ADN<sup>22</sup> a partir de restos óseos son las siguientes:

1. Escasez de ADN;
2. Fragmentación de las cadenas de ADN;
3. Modificaciones moleculares debidas a los propios productos de degradación del material genético;
4. Presencia de inhibidores de la PCR en los extractos<sup>23</sup>.

Aun así, con todo lo visto anteriormente, debemos considerar que la forma de preservación más importante del ADN está en los dientes y en los huesos<sup>2425</sup>, donde la molécula queda comprimida entre los cristales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) los cuales tienen una alta afinidad por el ADN y lo estabilizan<sup>26</sup>. Además, la cantidad de agua y de enzimas degradantes que contiene el hueso son relativamente poca, y el tejido óseo actúa como una barrera física a factores externos tales como la luz ultravioleta y los microorganismos<sup>27</sup>.

Los dientes, presentan una estructura conformada por una capa de esmalte y el cemento que protegen a la dentina que a su vez envuelve a la pulpa dentaria que tiene una alta concentración celular, la estructura dentaria también presenta otras células como los cementoblastos, cementocitos y odontoblastos.

Estas son algunas de las razones por la que se recomienda realizar procedimientos de aislamiento de ADN, en restos óseos antiguos, y en cadáveres putrefactos o carbonizados a

---

<sup>21</sup> G. Eglinton y G.A. Logan, "Molecular preservation," . *Philosophical. Transactions of the Royal Society*, 315-328, 1991.

<sup>22</sup> M.N. Hochmeister, B. Budowle B., et al. "Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains,". *Journal of Forensic Sciences*, vol. 36: 320-330, 1991.

<sup>23</sup> A. Akane, H. Shiono, et al, "Purification of forensic specimens for the polymerase," *Journal of Forensic Science*, vol. 38:3, pp. 691-703, 1993.

<sup>24</sup> M.M. Holland, D.L. Fisher D.L., et al, "Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war," *Journal of Forensic Sciences*, vol. 38, pp.542-553, 1993.

<sup>25</sup> E. Hagelberg B. Sykes, "Ancient bone DNA amplified," *Nature* 342: 485, 1989.

<sup>26</sup> D. Freifelder, "Physical Biochemistry:. New York, 1982.

<sup>27</sup> S. Hummel y B. Herrman, "General aspects of sample preparation," in B. Shapiro, et al, *Ancient DNA*, Springer-Verlag. New York, 1994.

partir de muestras obtenidas en tejido óseo compacto que se halla en diáfisis de huesos largos y en piezas dentarias, ya que ahí es donde se conserva mejor el ADN<sup>2829</sup>.

## **Muestras objeto de estudio**

El mayor desafío al que se enfrenta un antropólogo cuando una fosa común es descubierta, es la presencia en la misma de varios cuerpos esqueletizados<sup>30</sup>, donde en muchos casos los mismos se encuentran mezclados y además fragmentados.

Su labor será la clasificación de los mismos para determinar el mínimo número de individuos presentes y así poder remitir al laboratorio las muestras más apropiadas a fin de lograr la identificación de dichos restos<sup>31</sup>.

La cantidad de hueso deseable rondaría entre los 5 a 15 gramos. Las muestras grandes pueden proporcionar una mayor probabilidad de éxito en las pruebas de ADN en casos de restos muy degradados. Sin embargo, dependiendo de las circunstancias y la conservación, muestras más pequeñas de hueso de hasta 4 gramos y excepcionalmente menos de 1 gramo pueden ser susceptibles de obtener ADN y dar un resultado de identificación positivo<sup>3233</sup>.

A continuación, se exponen dos tablas muy significativas, donde podemos apreciar la prioridad de unas muestras post-mortem frente a otras, todo ello basado en estudios llevados a cabo por ICMP<sup>34</sup> en más de 20.000 muestras analizadas.

Cuando las muestras son recibidas por el personal competente y abiertas para su examen preliminar en el cuarto habilitado al efecto, lo primero que debe ocurrir es la perfecta identificación e incorporación al sistema de gestión de muestras empleado por el laboratorio, éste mostrará en cada momento, el camino que ha recorrido la muestra, desde su llegada, durante el proceso de análisis, y hasta su salida y destino definitivo, una vez se han concluido todos los estudios pertinentes tendentes a lograr una identificación.

Todo laboratorio acreditado debe manejar siempre dos conceptos fundamentales, **Trazabilidad y Cadena de custodia**. Todo ello evitará posibles acusaciones posteriores acerca de manipulaciones o conductas erróneas que pudieran comprometer la integridad de las pruebas.

---

<sup>28</sup> M.N. Hochmeister and B. Budowle., et al, "Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains," *Journal of Forensic Sciences*, vol. 36: 320-330, 1991.

<sup>29</sup> R.E. Gaensslen y H.C. Lee H.C, "Genetic markers in human bone tissue," *Forensic Science Review*, vol.2: 125-146, 1990.

<sup>30</sup> B. Morera-Brenesy G. Jiménez-Arce "Identificación de restos óseos humanos mediante análisis de ADN," *Medicina Legal de Costa Rica*, vol 15, pp. 6-7, 1998.

<sup>31</sup> E. Hagelberg, I.S. Bell., et al., "Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications," *Philosophical Transactions of the Royal Society, London*, 333: 399-407, 1991.

<sup>32</sup> S. Hummel y B. Herrman, "General aspects of sample preparation," in B. Shapiro, et al, *Ancient DNA*. Ed. Springer-Verlag. New York, 1994.

<sup>33</sup> B. Morera-Brenesy G. Jiménez-Arce, G., "Identificación de restos óseos humanos mediante análisis de ADN", *Medicina Legal de Costa Rica*, vol 15, pp. 6-7, 1998.

Región	Hueso/Pieza dental	Prioridad
Cabeza	Diente-Mandíbula	1
	Diente-Maxilar	1
	Temporal	1
	Mandíbula	2
	Occipital	3
	Parietal	4
	Cráneo-Otra bóveda craneal	4
	Huesos faciales del cráneo	6
Torso	Pelvis	1
	Vertebra-Cervical	1
	Vertebra-Lumbar	1
	Vertebra-Torácica	1
	Escapula	3
	Costilla	4
	Clavícula	5
	Sacro	6
Esternón/Manubrio	6	

Región	Hueso/Pieza dental	Prioridad
Brazo	Húmero	4
	Radio	5
	Cubito	5
Mano	Metacarpo	3
	Carpo	4
	Falange-Mano	4
Pierna	Fémur	1
	Tibia	1
	Fíbula	2
	Rotula	3
	Metatarso	1
	Astrágalo	2
Pie	Tarsal (otros huesos tarsales)	3
	Calcáneo	3
	Falange-Pie	4

Tabla 3. Prioridad de muestras post-mortem

## Etiquetado y limpieza exterior de las muestras óseas y dientes usando métodos físicos. Herramienta Dremel

Antes de comenzar con el importantísimo punto de la limpieza previa a la extracción, debemos etiquetar los tubos, donde contendremos nuestros fragmentos de hueso y dientes perfectamente limpios. Esta numeración o código de barras, que va impresa en nuestras etiquetas, será proporcionada por nuestro sistema de gestión de muestras, y en caso de no poder ser así, se llevará a cabo mediante una rotulación con material indeleble<sup>34</sup>.

Una vez tenemos nuestros tubos de 50 mL perfectamente etiquetados o rotulados, tanto en la parte habilitada del tubo, como en la propia tapadera, ambos códigos perfectamente visibles, pasamos al proceso de la limpieza mecánica o física de los elementos esqueléticos, esto se llevará a cabo a través de una herramienta tipo Dremel<sup>35</sup>. De esta forma eliminaremos los contaminantes que estén depositados en la superficie de la muestra objeto de estudio.

Esta herramienta presenta distintas fresas lijadoras, las cuales, pueden ser intercambiadas según las necesidades que nos encontremos, en función de cómo se presente el hueso o diente a limpiar, así como su tamaño.

La Dremel es ideal para este trabajo, ya que proporciona un par elevado en rangos de

<sup>34</sup> ICMP, Standard Operating Procedure for bone sample reception and handling. ICMP.SOP.LS.12.20.doc

<sup>35</sup> ICMP, Standard Operating Procedure for bone/tooth samples washing and grinding. ICMP.SOP.LS.31.19.doc

## MÓDULO 2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE RESTOS ÓSEOS Y DIENTES PARA SU POSTERIOR EXTRACCIÓN

velocidades reducidos, muy importante cuando hablamos de trabajos que requieren precisión, es decir, una elevada potencia a un número de revoluciones más reducido.

El proceso de lijado es sencillo, se hacen varias pasadas, sin ejercer demasiada presión, con la Dremel sobre la superficie del hueso o diente a fin de eliminar el posible ADN exógeno, del momento de recolección en el lugar de hallazgo, así como los distintos microorganismos que pudieran haber colonizado su superficie, veremos cómo se van limpiando los huesos y dientes mostrándonos cada vez un aspecto más blanquecino.

Debemos tener precaución con el polvo de hueso que se desprende del lijado, pues una exposición continua en el tiempo sin las medidas de protección adecuadas podría causar Neumoconiosis y enfermedades broncopulmonares, por ello se aconseja, llevarlo a cabo siempre en una campana con flujo de extracción laminar, o si no es posible, en una campana que tenga adherido un sistema de aspiración. Sin olvidar, huelga decir, los sistemas de protección individual del operador de la muestra (guantes, mascarilla, gafas de protección).

Hasta ahora hemos analizado el camino a recorrer partiendo de un fragmento de hueso o de un diente, es decir, una muestra fácilmente manejable, que pasaría directamente a la etapa de lijado, pero puede ser, que nos llegue a nuestro laboratorio un hueso largo y debamos cortarlo a fin de obtener un fragmento.

Para llevar a cabo el corte del mismo debemos contar con el equipo adecuado siguiendo en todo momento las medidas de prevención de riesgos laborales.

Con una sierra de cirujano, produciremos un corte longitudinal al hueso a fin de obtener un fragmento del mismo, se recomienda el corte longitudinal y no el vertical ya que de esta manera evitaremos posibles pérdidas. Una de las sierras de cirujano más utilizadas al efecto, es la que tiene incorporado un sistema propio de aspiración (medezine swordfish 4000).

Si el fragmento de hueso que hemos cortado, o bien el que nos vino de origen, es demasiado grande, debemos fragmentarlo, para ello envolvemos la muestra varias veces en papel de laboratorio y con un martillo le damos varios golpes secos.

Todos los fragmentos de hueso obtenidos deben ser pesado a fin de saber de qué cantidad partimos, esto es imprescindible, como veremos más adelante, para calcular los volúmenes necesarios de los reactivos a emplear. Una vez fragmentados serán introducidos en su tubo previamente rotulado a fin de pasar a la etapa siguiente del proceso.

## 2.2. Revisión de los procedimientos usados para el Lavado, secado y Pulverizado de los restos óseos y dientes.

Las muestras cuando llegan al laboratorio son examinadas de manera visual a fin de determinar su estado, así podemos descubrir en algunos restos óseos y dientes la presencia de moho, el cual debe eliminarse tanto mecánicamente con pinzas o frotando, antes del procedimiento en sí de lavado, el cual podemos decir que se lleva a cabo mediante el uso de agentes químicos.

### Proceso de Lavado

Antes de comenzar el proceso de lavado debemos preparar todos los reactivos y consumibles que vamos a necesitar y colocarlos en nuestra estación de trabajo:

- Bote con lejía comercial al 10%;
- Etanol al 70%;
- Agua, preferiblemente desionizada.

#### Etapas

1. **Primera etapa:** Consta de dos lavados con lejía al 10% sumergiendo las muestras completamente, agitándolas de forma vigorosa durante 30 segundos. Antes de pasar al siguiente lavado se desecha esa lejía ya usada, echamos nueva y repetimos el proceso.
2. **Segunda etapa:** Consta de otros dos lavados con agua del grifo con la muestra completamente sumergida, agitando vigorosamente durante 30 segundos. Después de los dos lavados dejamos la muestra sumergida en el agua durante no menos de cinco minutos.
3. **Tercera etapa:** Consta de otros dos lavados con etanol al 70 % con agitación vigorosa durante 20-30 segundos, desechando el etanol usado cada vez.

Por lo tanto y a modo de resumen diremos que los métodos que podemos emplear para limpiar un hueso o diente son lejía, campana ultravioleta y lijado con Dremel, todos ellos pueden hacerse de modo independiente o de forma combinada.

## Proceso de secado

### Etapas

1. Los tubos que contienen las muestras lavadas se abren de uno en uno, y las tapas etiquetadas se colocan sobre un papel de laboratorio. Una vez que se han destapado todos los tubos, los tapones se cubren con otra hoja de papel de laboratorio.
2. Compruebe y anote la temperatura del horno en su hoja de control antes de comenzar el secado de la muestra.
3. Los tubos de muestra sin tapar, que tenemos en nuestra gradilla, se colocan en una bandeja dentro del horno para que se sequen a  $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante la noche.
4. Rellene la hoja de control de inicio de secado del protocolo de calidad.
5. Una vez que se completa el secado, los tubos se cierran con sus correspondientes tapaderas etiquetadas con el código de barras.
6. Rellene la hoja de control de finalización de secado del protocolo de calidad.

## Proceso Pre-pulverizado

Todo el equipo y materiales que vayamos a utilizar para el pulverizado deben estar perfectamente limpios.

Limpiar la campana por fuera y por dentro, así como todos los equipos que vayamos a usar (batidora, mesas de trabajo) todo perfectamente limpio usando un papel empapado en lejía al 10%.

Utilizar el papel de laboratorio para eliminar el exceso o residuos de lejía, ya que un exceso podría ser perjudicial para la salud del analista.

Poner un papel de filtro en el interior de la campana donde vaya a comenzar a trabajar.

En cada mesa de trabajo debemos tener preparado el siguiente material:

- Botella de lejía recién preparada al 10%;
- Botella de Liqui-Nox al 1%;
- Papel de laboratorio;
- Platos de pesaje;
- Gradillas para tubos limpias;
- Tubos estériles de 50mL.

## Proceso de Pulverizado

Antes de comenzar a pulverizar cada muestra necesitamos una hoja control de lo que vamos a realizar, donde tengamos un listado con el número de identificador de nuestras muestras y su posición. Esta hoja tenemos que sacarla desde nuestro software de laboratorio.

Una vez que tenemos la lista preparada vamos a generar los códigos de barras y etiquetas necesarias para el proceso.

Etiquetamos los tubos de 50mL que tenemos preparados con nuestros códigos de barras, los cuales hemos obtenido de nuestro software y escribimos el mismo número de código de barras en la tapa indicando si la muestra pertenece a la serie A o B. (El pesaje de la serie B es opcional).

Del mismo modo, es decir, utilizando nuestras hojas de cálculo determinaremos los volúmenes necesarios de cada reactivo en función del peso de la muestra una vez lo hayamos fragmentado y pulverizado.

Punto para la verificación de testigo. Tres cosas a comprobar; registro de pulverización generado por nuestro software, tubos de lavado y nuevos tubos de 50 mL.

Comencemos a triturar el fragmento:

1. Encienda el extractor portátil.
2. Coloque todos los fragmentos en el interior de la batidora y asegúrese de que la tapadera este perfectamente cerrada.
3. Triture los fragmentos durante dos minutos, Si algunos trozos no se han triturado quitamos el polvo obtenido y continuamos triturando los fragmentos grandes.
4. Una vez tenemos el polvo de hueso, lo pesamos y lo transferiremos al tubo de lavado.
5. Repetiremos el proceso con todas las demás muestras.
6. Limpiamos la superficie externa del tubo con un papel empapado en lejía y lo colocamos en nuestra gradilla limpia.
7. Ahora pasamos a limpiar el vaso de la batidora con un pequeño volumen de Liqui-Nox al 1% que dejamos actuar durante 10-20 segundos a fin de enjuagar todo el vaso y la tapadera. También limpiamos las superficies de la base de la batidora. Este proceso debemos hacerlo por cada muestra que tengamos que pulverizar.
8. Cambiamos los guantes exteriores.

Finalizado el procedimiento de trituración, los analistas deben separar cada muestra en sus tubos en serie (A, B y sobrantes) según la cantidad de polvo de muestra disponible.

## MÓDULO 2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DE RESTOS ÓSEOS Y DIENTES PARA SU POSTERIOR EXTRACCIÓN

Si hay suficiente polvo de muestra disponible, las muestras deben separarse de la siguiente manera:

- La serie A debe contener aproximadamente 1 g de polvo de muestra;
- La serie B debe contener aproximadamente 0,5 g de polvo de muestra.;
- La reserva (sobrante) debe contener el resto del polvo de muestra. Este polvo también debe ser pesado.

En relación a la cantidad de polvo disponible podemos encontrarnos dos situaciones:

- A.- Situaciones donde el polvo de muestra disponible está entre 1.0 g-1.5 g, el polvo de muestra debe dividirse equitativamente entre las series A y B;
- B.- Situaciones en las que el polvo de muestra disponible sea inferior a 1,0 g, el polvo de muestra debe asignarse únicamente a la Serie A;

**NOTA:** Si el peso en la etapa de prelavado es igual o inferior a 1,5 g, verifique la diferencia de peso entre los pasos de prelavado y post-triturado. Si la diferencia de peso es  $\geq 0,5$  g, notifíquese al jefe del Laboratorio de ADN por la vía indicada.

- Punto de verificación de testigos.

Se verificará el procedimiento de pesaje y la división de la muestra a fin de asegurarnos que el dato apuntado en a la hoja de seguimiento es el correcto

Una vez terminada una etapa tan importante como la ya vista, debemos asegurarnos de que todo queda perfectamente limpio para la próxima vez, por ello debemos:

- Limpiar a fondo y de uno en uno todos los vasos y tapas de la batidora con detergente y agua del grifo;
- Asegúrate de lavar bien el área debajo de la cuchilla;
- Limpia el interior y el exterior de la tapadera a fondo con una esponja;
- Ahora coloque todos los vasos y tapas en otro fregadero para impregnarlas con una solución de agua Liqui-Nox® caliente durante al menos 5 minutos;
- Enjuague los vasos y las tapaderas con agua del grifo;
- Sumérgalos en una solución de lejía comercial al 10% (en un recipiente de plástico) durante al menos 30 minutos;
- Enjuague los vasos y las tapas de la batidora con agua del grifo y luego con etanol  $\geq 96\%$  y déjelas secar al aire en la rejilla de secado;
- Las gradillas de plástico para tubos de 50 ml deben limpiarse con una solución comercial de lejía al 10% después enjuáguelas con agua del grifo y rocíe con EtOH al 70%, luego deje secar completamente al aire.



# **MÓDULO 3**

**PROTOCOLO ESTÁNDAR DE  
ICMP DE EXTRACCIÓN  
MANUAL DE ADN**



## MÓDULO 3.

# Protocolo estándar de ICMP de extracción manual de ADN

En genética forense un protocolo comprende los diferentes pasos que se siguen en un laboratorio para obtener un resultado a partir de una muestra problema, en este caso hablaremos de muestras biológicas. El fin último de nuestro protocolo, es la obtención de un extracto de ADN puro que nos permita obtener un perfil genético susceptible de producir una identificación.

Todo protocolo debe incluir los reactivos y los equipos que se utilizan para dicho fin.

En este tercer modulo vamos a detallar como llevamos a cabo en ICMP la extracción manual de ADN mediante el método de desmineralización completa para restos óseos y dientes. Como ya hemos visto en el módulo I, el primer paso para llevar a cabo la extracción de ADN es la lisis celular.

La lisis celular, consiste en romper las interacciones presentes entre las distintas moléculas que conforman la pared, membrana celular y nuclear y de esta manera aislar dicha molécula de ADN en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares.

Dentro de la célula como ya sabemos tenemos dos tipos de ADN, el ADN nuclear contenido en el interior del núcleo y el ADN mitocondrial contenido en el interior de las mitocondrias. Nuestro objetivo es una identificación individual y para ello necesitamos un ADN nuclear, ya que el ADN mitocondrial solo nos aportaría relaciones por linaje materno<sup>36</sup>, pero no podríamos distinguir entre individuos relacionados por línea materna. Desgraciadamente en algunas ocasiones solo podremos establecer este tipo de relaciones materno-filiales.

---

<sup>36</sup> Giles R.E., Blanc H., Cann H.M. y Wallace D.C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6715-6719.

## 3.1. Proceso manual de extracción de ADN por de Desmineralización completa de Huesos y Dientes

La aparición de restos cadavéricos sin identificación o cuya identidad se sospecha, en los que no se puede establecer por métodos tradicionales (antropológicos, odontológicos, etc.), obliga a recurrir a los estudios genéticos como única vía posible de identificación.

Los laboratorios de Genética Forense utilizan un protocolo de identificación humana u otro [16], en función a una mayor o menor complejidad de las muestras cadavéricas que se disponga para realizar la investigación, así como la disponibilidad de muestras de referencia para poder identificar los restos óseos, estas dos circunstancias permitirán decidir por una u otra estrategia de resolución, que puede clasificarse de acuerdo al caso primero en función del tipo de muestra que debemos analizar, segundo en función del análisis comparativo y tercero en función del tipo de caso.

La extracción de ADN<sup>37 38</sup>a partir de restos óseos es una herramienta muy utilizada en el ámbito forense<sup>39</sup> para la identificación de cadáveres de individuos que no presentan en su anatomía tejidos blandos, o bien cuando presentan un grado de deterioro en tejido, por descomposición, daño o por quemaduras.

El protocolo de desmineralización completa de ICMP<sup>40</sup> consiste en tres pasos principales, la desmineralización del resto óseo o diente, la concentración del lisado obtenido y la purificación de dicho lisado.

Comenzaremos la exposición del protocolo con una fase previa, que siempre debe realizarse en un laboratorio de genética forense, independientemente del protocolo o proceso que estemos llevando a cabo, la preparación de la mesa de trabajo.

### Limpieza de la zona de trabajo y del material a utilizar

Todas las superficies de trabajo deben limpiarse con lejía la cual preparamos a una concentración del 10%, posteriormente lo secaremos todo con papel secante y rociaremos con etanol al 70 % y dejaremos secar al aire. Iremos haciendo lo mismo con todos los equipos y materiales que necesitemos utilizar:

- Sacamos todo el material fuera de la campana, limpiamos la superficie y paredes de la misma y a continuación conectamos la luz UV durante un tiempo de 30 minutos. Transcurrido este tiempo tenemos nuestra campana lista para trabajar.
- Limpiamos el **material de plástico** (gradilla, bote de residuos,) con nuestra lejía al 10% aclaramos todo con agua y rociamos con etanol al 70% y dejamos secar.

<sup>37</sup> J.E.Stray, J.Y.Liu, M.G. Brevnov and J.G. Shewale " Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping, "Forensic Science Review, vol 22, pp 169-175,2010.

<sup>38</sup> J.E.S.J.G.Stray, " Extraction of DNA from human remains, " "Forensic Science Review, vol 22, pp 177-185,2010.

<sup>39</sup> Peerson P. 1992. A method to recover DNA from ancient bones. Ancient DNA. Newsletter 1: 25-27.

<sup>40</sup> Standard Operating Procedure for full demineralization DNA extraction from skeletal remains. ICMP.SOP.LS.85.13.doc.

### MÓDULO 3: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP DE EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN

- Limpiamos las **centrifugas**: cada elemento de la centrifuga se limpia con lejía, se aclara con agua, se rocía con etanol al 70% y se deja secar.
- **Limpiamos nuestras pipetas** con solución DNA away y una vez actuado le pasamos con papel empapado en etanol al 70% y lo dejamos secar.
- **Limpiamos todas las superficies** que vayamos a utilizar con lejía al 10%.
- **Limpiamos el interior del horno** con lejía al 10% incluyendo la plataforma móvil y posteriormente rociamos con el agente comercial limpiador y por último etanol al 70% y lo dejamos secar.

**NOTA:** Cualquier bote de reactivo que preparemos tiene que estar perfectamente etiquetado con la fecha de preparación, el nombre del analista que lo ha llevado a cabo, concentración.

### Etapa de Pre-Extracción

Comenzaremos esta etapa preparando nuestra lejía comercial al 10%, para ello tenga en cuenta que la lejía comercial generalmente contiene 5-7% de hipoclorito de sodio, por lo que nuestra solución de lejía al 10% debe contener el 10% de hipoclorito de sodio.

Esta solución de lejía comercial al 10% es imprescindible para todos los pasos de limpieza que tenemos que llevar a cabo durante el proceso de extracción y se debe preparar diariamente antes de cada uso.

Elija el bote donde la va a preparar y determine el tamaño del mismo. Luego, mida un volumen de lejía comercial equivalente al 10% del volumen de la botella utilizada con un medidor y viértalo con cuidado en la botella. Llene la botella con agua del grifo para diluir la lejía comercial hasta una solución al 10%.

Etiquete la botella que contiene la solución de lejía comercial al 10% con las iniciales del analista que lo preparó y la fecha de preparación.



Imagen 12: Protocolo estándar de ICMP, preparación solución de lejía

## Preparación del Buffer de desmineralización

El tampón de desmineralización se utiliza para disolver el polvo de hueso lo más completamente posible con el fin de liberar el ADN contenido en el interior del hueso. Para crear este tampón, usaremos EDTA 0,5 M y N-laurilsarcosinato de sodio.

### EDTA:

- Descalcifica el hueso.
- Agente quelante que atrapa los iones  $Mg^{2+}$  usados por las DNAasas como cofactores.
- La ausencia de esos iones propicia la desactivación de la enzima y por tanto evita la degradación del ADN.
- Disminuye los contaminantes en el extracto que tienden a precipitar con el ADN y causar la inhibición de la PCR (Jiménez&Morera, 2007).

### N-laurilsarcosinato de sodio:

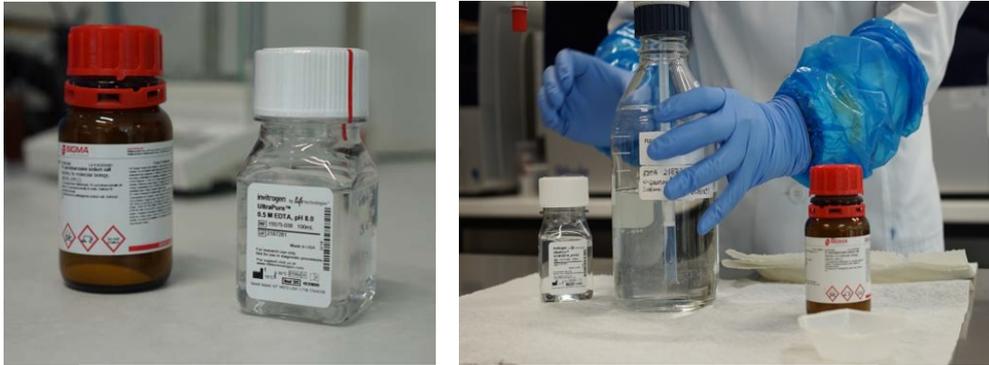
- Detergente aniónico.
- Actúa como tensioactivo iónico.
- Todo detergente actúa alterando la membrana celular que contiene los lípidos.
- Ayuda a romper las proteínas no solo de las membranas celulares.
- Alto poder espumante incluso a bajas temperaturas.

Para preparar el tampón de desmineralización completa, usaremos una botella de vidrio o un vaso de precipitados de vidrio estéril.

Por cada 100 ml de EDTA 0,5 M, se debe agregar 1 g de N-laurilsarcosinato de sodio para hacer una solución al 1%. Pese el polvo de N-laurilsarcosinato de sodio y asegúrese de tener el volumen requerido de 0,5 M EDTA disponible para su uso.

### MÓDULO 3: PROTOCOLO ESTÁNDAR DE ICMP DE EXTRACCIÓN MANUAL DE ADN

Vierta el volumen requerido de EDTA 0,5 M en la botella o vaso de precipitados en el que vaya a preparar el tampón de desmineralización. Añada lentamente la cantidad de polvo de N-laurilsarcosinato de sodio pesado, y mezcle el tampón suavemente hasta que el polvo de N-laurilsarcosinato de sodio este completamente disuelto. Puede utilizar una plataforma de agitación para disolverlo completamente, pero también podría conseguirse sin usar dicha plataforma.



*Imagen 13: Protocolo estándar de ICMP, preparación tampón de desmineralización completa*

Si ha preparado el tampón de desmineralización completo en un vaso de precipitados de vidrio, debe transferirlo a una botella limpia y estéril una vez que el polvo de N-laurilsarcosinato se haya disuelto completamente.

Puede resultarle útil utilizar una botella con dispensador, ya que esto facilitará la preparación de alícuotas del tampón de desmineralización en el volumen correcto para cada muestra cuando necesite utilizar dicho tampón.

El nombre del analista, la fecha de preparación y los números de lote de EDTA y N-laurilsarcosinato de sodio deben ponerse también en la botella, donde hemos preparado el Buffer.

Recomendamos hacer un tampón nuevo para cada extracción, pero también puede almacenarse el ya preparado en el frigorífico a 4 ° C hasta un periodo de dos semanas.

## Preparación de la Proteinasa K

Es posible comprar la solución de proteinasa K en la concentración correcta para el protocolo de extracción de desmineralización completa de ICMP. Pero a continuación pasamos a explicar cómo podemos prepararla nosotros en nuestro laboratorio.

### Proteinasa K

- Enzima altamente reactiva que descompone las proteínas;
- Inactiva las nucleasas que degradan el ADN y que potencialmente inhiben la PCR;
- Es estable en un amplio rango de pH (4-12);
- El aumento de la temperatura de reacción de 37°C a 50-60°C puede aumentar su

- actividad varias veces;
- En si misma es un potencial inhibidor<sup>41</sup> de la PCR, ya que puede alterar las enzimas utilizadas en la PCR, por ello debe ser eliminada durante la purificación.

Para nuestro protocolo de desmineralización completa<sup>42</sup>, necesitamos usar una solución de Proteinasa K con una concentración final de 10 mg/mL. Para ello pesamos 100 mg de proteinasa K en polvo y la disolvemos en 10 mL de agua ultra pura.

Ponga los 100 mg de Proteinasa K en un tubo falcon, añada el volumen requerido de agua y agite el tubo Falcon o recipiente que haya utilizado para para disolver el polvo. Una vez preparada, la Proteinasa K debe almacenarse en el congelador a -20 ° C.

La solución de proteinasa K preparada, se puede dividir en alícuotas de volúmenes más pequeños. Recomendamos que cada alícuota contenga suficiente volumen para procesar un conjunto de muestras. Si va a optar por la opción de la preparación de alícuotas, no olvide incluir el volumen requerido también para el control negativo que acompaña a cada proceso de extracción.

La gran ventaja de preparar alícuotas de proteinasa K, es que nos será más fácil descongelar sólo el volumen necesario para procesar las muestras que vamos a extraer. Marque todas las alícuotas con las iniciales del analista, la fecha de preparación y el número de lote de la proteinasa K. La concentración de proteinasa K también debe estar reflejada en cada alícuota.



Imagen 14: Protocolo estándar de ICMP, proteinasa K

*Para ver el proceso de preparación de reactivos para el protocolo de extracción de ADN de desmineralización completa de ICMP, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*



*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga:*  
<https://vimeo.com/652529937>

<sup>41</sup> A. Akane, H. Shiono, et al, " Purification of forensic specimens for the polymerase," *Journal of Forensic Science*, 1993.

<sup>42</sup> ICMP, Standard Operating Procedure for full demineralization DNA extraction from skeletal remains. ICMP.SOP.LS.85.13.doc.

## Preparación de las muestras

En esta etapa vamos a ver como llevamos a cabo la preparación de las muestras, para ello hemos previamente hemos preparado nuestra mesa/campana de trabajo, tal y como ya hemos visto en apartados anteriores, y ahora debemos colocar en el interior de la campana todo lo necesario para comenzar este paso, tubos, puntas, pipetas, toallas de papel para la lejía, así como las hojas de laboratorio que sean necesarias.

Normalmente para este protocolo utilizamos un gramo de polvo de hueso, el cual hemos depositaremos en el interior de un tubo falcon de 50 mL. Lo recomendable es dejar preparada la tanda de muestras para extraer el día anterior. Esta preparación también incluye el etiquetado de cada tubo, tanto en la propia zona del tubo habilitada como en la tapadera. Recuerda que ambos códigos deben ser fácilmente visibles.

Tome la tanda de muestras y limpie cada tubo cuidadosamente con una toalla o papel empapado en lejía al 10%.

En este punto y antes de comenzar a dispensar cada uno de los reactivos, debemos verificar que todo está correcto. Para ello un analista externo a quien va a realizar la extracción, debe comprobar que los tubos están perfectamente etiquetados, que esa etiquetación coincide con la relación que hay en nuestra hoja de laboratorio y que todo va según marca el protocolo.

## 3.2. Desmineralización del Hueso

### Proceso de Digestión

1. Recoja el conjunto de muestras preensambladas y el papeleo de la sala de recepción de muestras.



Imagen 15: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 1

2. Asegúrese de limpiar cada tubo de muestra con lejía al 10% antes de transferirlo a una gradilla limpia de 50 mL.



Imagen 16: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 2

3. Según el procedimiento operativo estándar de ICMP, se necesita 1 gramo de polvo de hueso en cada uno de los tubos para este proceso.

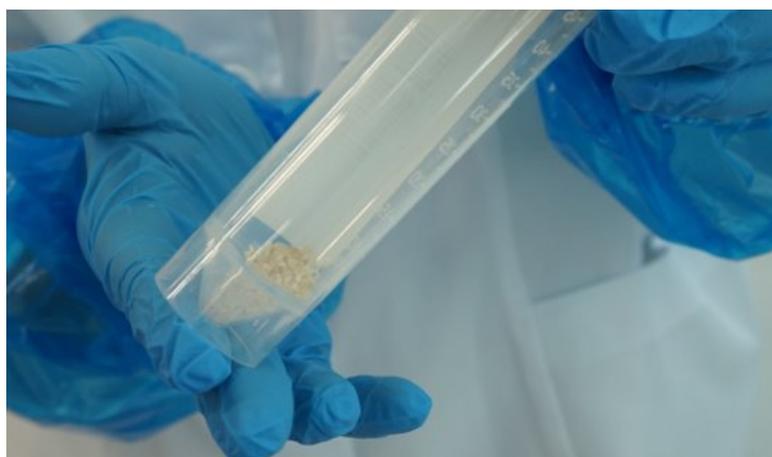


Imagen 17: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 3

4. El personal del laboratorio tiene que ser capaz de gestionar y controlar todas las etapas del proceso a través del sistema de gestión de datos del laboratorio.

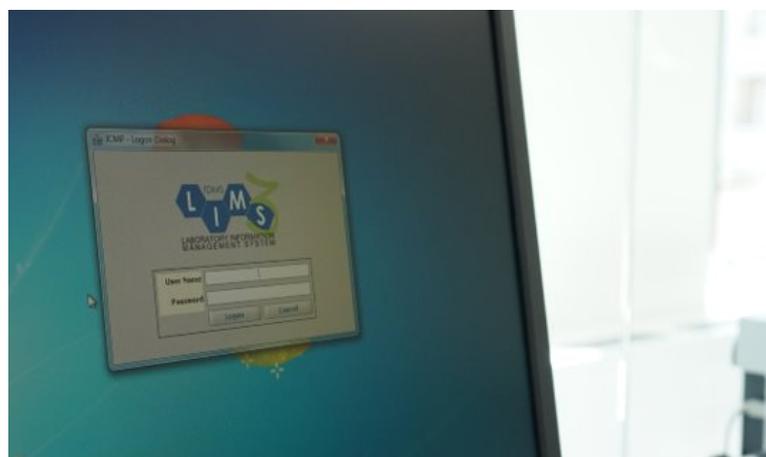


Imagen 18: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 4

5. Por esta razón, los tubos están debidamente etiquetados con un código de barras y todas las muestras son escaneadas.



Imagen 19: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 5

6. Todos los tapones también deben estar etiquetados.

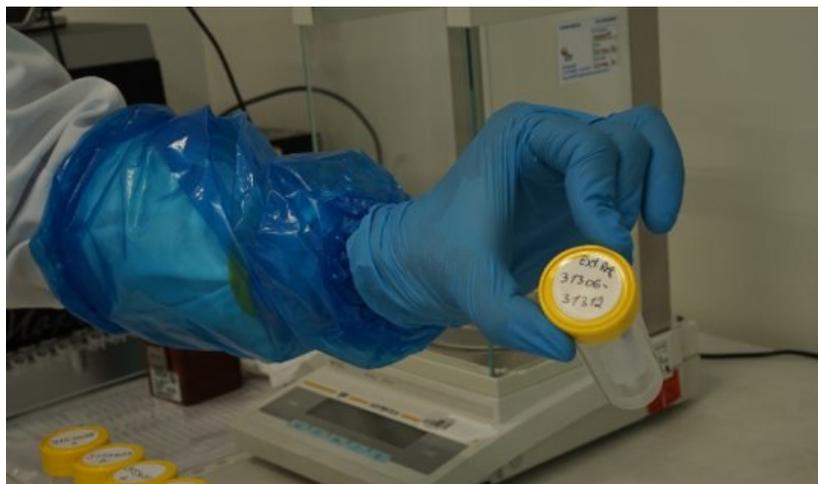


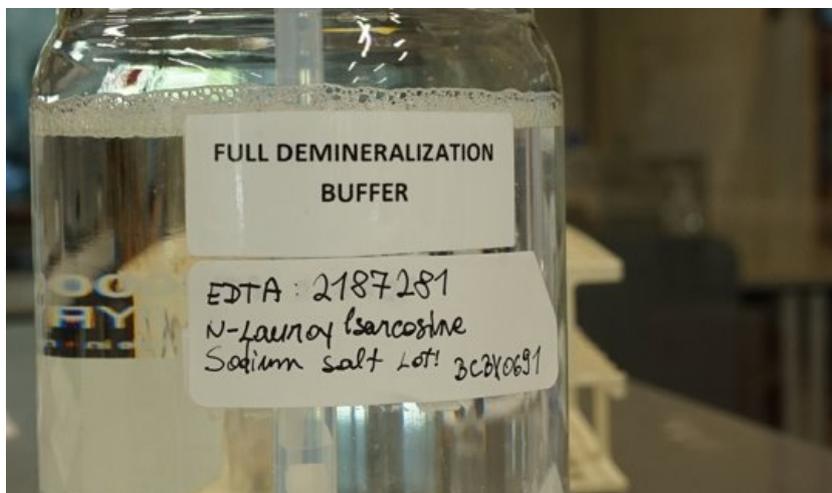
Imagen 20: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 6

7. Un testigo comprueba que la información de los formularios, los tubos y el sistema de gestión de datos del laboratorio, también conocido como LIMS, coinciden.



Imagen 21: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 7

8. Ahora, estamos listos para comenzar con el proceso de digestión.
9. Vamos a añadir a cada uno de los tubos el tampón de desmineralización, también conocido como tampón Demin, que aprendimos a preparar en el último módulo.



*Imagen 22: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 9*

10. Deseche 15 mL de tampón de desmineralización en un recipiente de residuos, de esta forma nos aseguramos que no quedan burbujas de aire en el tubo dispensador.



*Imagen 23: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 10*

- 11.** Añada a cada muestra 15 mL de tampón Demin.



*Imagen 24: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso*

- 12.** Para evitar la formación de espuma y las salpicaduras, incline el tubo de muestras y dispense el tampón Demin por la pared interior del tubo.



*Imagen 25: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 12*

- 13.** Límpiese cuidadosamente las manos con lejía antes de pasar a la siguiente muestra.

- 14.** Cierre el tubo y devuélvalo a la gradilla.



*Imagen 26: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 14*

**15.** No olvide crear también su negativo de extracción, que le ayudará a determinar si se introdujo alguna contaminación a lo largo del proceso.

**16.** Transfiera la gradilla que contiene los tubos de muestra a la campana de extracción.



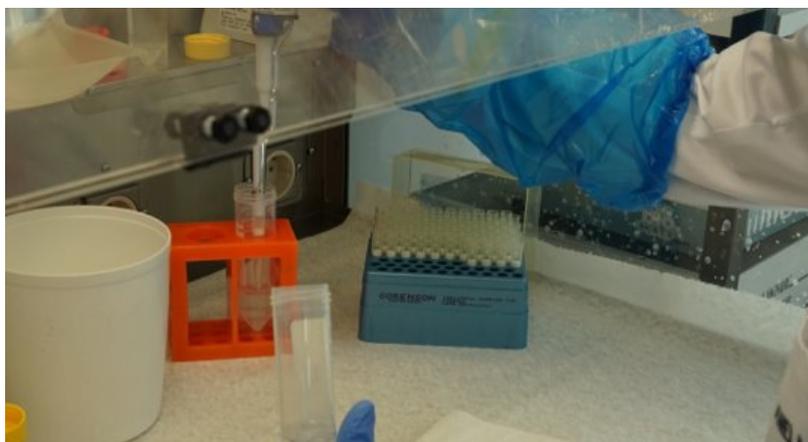
*Imagen 27: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 16*

**17.** Utilice una pipeta P-1000 para añadir la proteinasa K a cada muestra.



*Imagen 28: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 17*

**18.** Deberá utilizar una de las alícuotas de proteinasa K que preparó anteriormente.



*Imagen 29: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 18*

**19.** Añada 1000 microlitros de proteinasa K a cada muestra.



*Imagen 30: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso*

**20.** Cierre cuidadosamente el tubo de muestra después de la adición.



*Imagen 31: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 20*

**21.** Mezcle la muestra invirtiéndola varias veces para asegurarse que el contenido se mezcla completamente.



*Imagen 32: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 21*

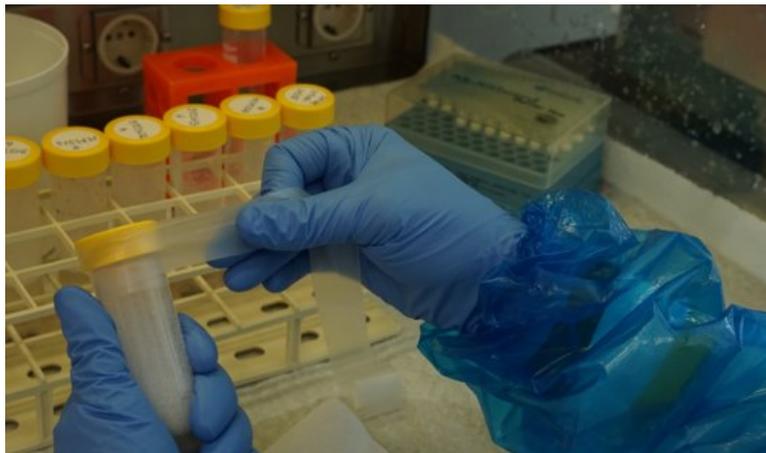
**22.** Límpiense cuidadosamente las manos en una toalla con lejía antes de pasar a la siguiente muestra.

- 23.** Asegúrese de desarrollar un sistema que le permita conocer las muestras que ya han sido procesadas.



*Imagen 33: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 23*

- 24.** Repita estos pasos hasta que haya procesado todos los tubos, incluido el negativo de extracción, que se procesará el último.
- 25.** Envuelva la parte superior de los tubos con parafina para evitar posibles fugas de líquido.



*Imagen 34: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 25*

- 26.** Lleve las muestras de la campana de extracción al horno de incubación.



*Imagen 35: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 26*

- 27.** Asegúrese de que se han colocado esteras limpias en la plataforma oscilante antes de colocar los tubos de muestras en la plataforma.

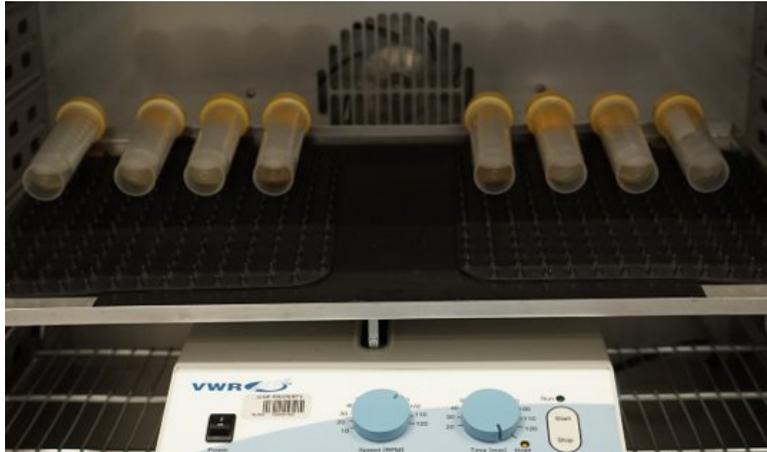


Imagen 36: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 27

- 28.** Ajuste la rotación de la plataforma oscilante a 90 rpm y pulse el botón de inicio.



Imagen 37: Protocolo estándar de ICMP, proceso de digestión, paso 28

- 29.** Cierre la puerta del horno de incubación.
- 30.** La temperatura de dicho horno debe estar en 56°C +/- 2°C.
- 31.** La digestión inicial debe realizarse durante al menos 12 horas, pero no más de 48 horas.

Para ahondar en el Protocolo de extracción de ADN de ICMP – Pasos de Desmineralización, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.

Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652531991>



## Proceso de Concentración del Lisado

Esta nueva etapa, tiene como objetivo concentrar el lisado que hemos obtenido después de permanecer las muestras en el horno de incubación durante toda la noche.

1. Después de que las muestras se hayan digerido durante la noche, apague el horno, abra la puerta y apague la plataforma oscilante.



*Imagen 38: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 1*

2. Es importante que el operador del laboratorio complete el formulario de monitoreo de las temperaturas del horno de incubación en esta etapa del proceso.



*Imagen 39: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 2*

3. Asegúrese de que todo el polvo de hueso ha sido digerido.



Imagen 40: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 3

4. También es importante asegurarse de que no se ha producido ninguna fuga durante la noche y de que el volumen final no es inferior a 15 ml.
5. Limpie cuidadosamente cada tubo de muestra con una toalla con lejía y transfíralo a una gradilla limpia.



Imagen 41: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 5

6. El líquido restante puede tener diferentes colores, dependiendo de la calidad de la muestra original, el tipo de suelo o si los fragmentos fueron quemados.



Imagen 42: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 6

7. Coloque los tubos de muestra en la centrifuga 5810.



*Imagen 43: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 7*

8. Es importante asegurarse de que la centrifuga esté bien equilibrada.



*Imagen 44: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 8 y 9*

9. A continuación, centrifugue durante 5 minutos a 3000 rpm.
10. Mientras las muestras se centrifugan, prepare un número igual de tubos Amicon Ultra-15, aquí mostrados en color rosa, y colóquelos en una gradilla limpia de 50 mL.



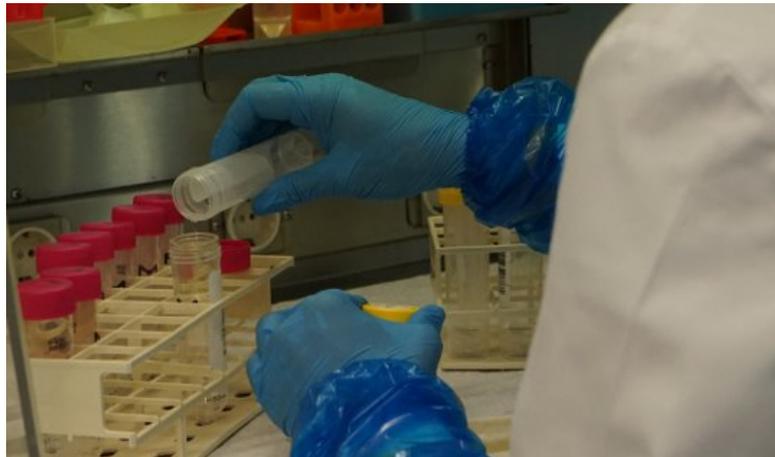
*Imagen 45: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 10*

11. Coloque los tubos dentro de la campana y etiquételos con el código de barras de la muestra correspondiente, tal como figura en la documentación de la extracción.



*Imagen 46: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 11*

12. Una vez finalizada la centrifugación, coloque los tubos de extracción de nuevo en la gradilla y vuelva a la campana.
13. Transfiera meticulosamente el lisado de cada tubo de muestra original al Amicon Ultra-15 etiquetado correspondiente.



*Imagen 47: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 12 y 13*

14. Límpiense las manos con una toalla con lejía antes de continuar con el siguiente tubo de muestra de la gradilla.

- 15.** Una vez transferido el lisado de todos los tubos, un operador independiente deberá realizar un control de testigos (witnesscheck).



*Imagen 48: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 15*

- 16.** El testigo se asegurará de que las muestras están en el orden correcto según la documentación y de que los códigos de barras del tubo de extracción, del Amicon Ultra-15 correspondiente y de la documentación coinciden.



*Imagen 49: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 16*

- 17.** El operador también comprobará que todos los líquidos han sido transferidos del tubo de extracción al Amicon Ultra-15.
- 18.** A continuación, el operador independiente firmará y fechará la parte de la comprobación del testigo en la documentación.
- 19.** Los tubos de extracción de 50 mL vacíos deben ser desechados a un contenedor de residuos de riesgo biológico una vez que se haya completado el control de testigos.

- 20.** Una vez completado este proceso, coloque los Amicon Ultra-15 en la centrífuga 5810. Al igual que en el proceso anterior, es importante asegurarse que las muestras estén equilibradas en la centrífuga.



*Imagen 50: Protocolo estándar de ICMP, proceso de concentración del lisado, paso 20*

- 21.** A continuación, centrifugar durante 30 minutos a 4000 rotaciones por minuto (rpm).
- 22.** Asegúrese de seguir registrando el proceso y de añadir los datos a su LIMS.

*Para ahondar en el Protocolo de extracción de ADN ICMP – Concentración del lisado con Amicones, por favor escanee con su celular el siguiente código QR*

*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652536008>*



## Proceso de Purificación usando las columnas QIAquick de QIAgen

En la etapa anterior conseguimos concentrar nuestro lisado y ahora debemos purificarlo, a fin de eliminar todo aquello que no nos interesa; proteínas solubles, ácidos nucleicos no deseados, lípidos, carbohidratos, sales y otros componentes orgánicos.

### Etapa de Unión

Para ello en el protocolo de extracción por desmineralización completa de ICMP usamos las columnas de centrifugación QIAquick de QIAgen, compuestas por la columna propiamente dicha y el tubo de recolección.



Imagen 51: Etapa de Unión, Columnas de centrifugación QIAquick

En este Kit también encontramos tubos de 2mL y tubos de 1.5 mL y los tres Buffers diferentes que vamos a tener que utilizar a lo largo de lo que queda de proceso de purificación. El tampón PB para unir el ADN a la membrana de la columna, el tampón PE para lavar la muestra y eliminar los restos celulares y los inhibidores y, finalmente, el tampón EB para eluir el ADN de la columna y recuperar así el extracto de ADN puro.

Mientras habíamos dejado los Millipore™ Amicon® Ultra-15 centrifugando en la etapa anterior, ese tiempo de espera lo hemos podido emplear para ir preparando todo el material que necesitaremos en esta nueva etapa:

- Número de columnas QIAquick necesarias en función del número de muestras, las cuales, también debemos rotular con el número de identificador de cada muestra;
- Tubos de 2 ml y tubos de 1,5 mL, en número igual al de muestras, perfectamente rotulados también.

Pasos:

1. Las Columnas QIAquick y los tubos de 2mL los ponemos en una misma gradilla, y los tubos de 1.5 mL en otra gradilla.



Imagen 53: Unión, paso 1, Tubos 2Ml



Imagen 54: Unión, paso 1, Columnas QIAquick



Imagen 55: Unión, paso 1, Tubos 1.5m

2. Es importante siempre asegurarnos de que todos los tubos están en el orden que deben estar y que este orden coincide con el descrito en la hoja de laboratorio.

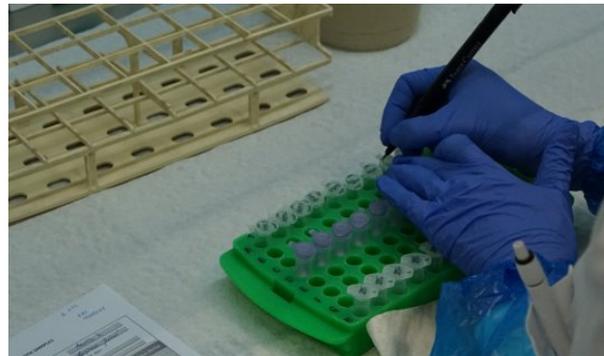


Imagen 56: Etapa de Unión, paso 2, orden de los tubos

3. Ahora vertemos en cada tubo de 2mL, 1.5 mL de PB Buffer, para ello utilizaremos las combitips o multipette de Eppendorf y los dejamos así preparados en nuestra gradilla.

Para ver el manual de Eppendorf, por favor escanee con su celular el siguiente código QR

Para acceder al manual de forma digital, diríjase a la siguiente liga:  
<https://www.eppendorf.com/>



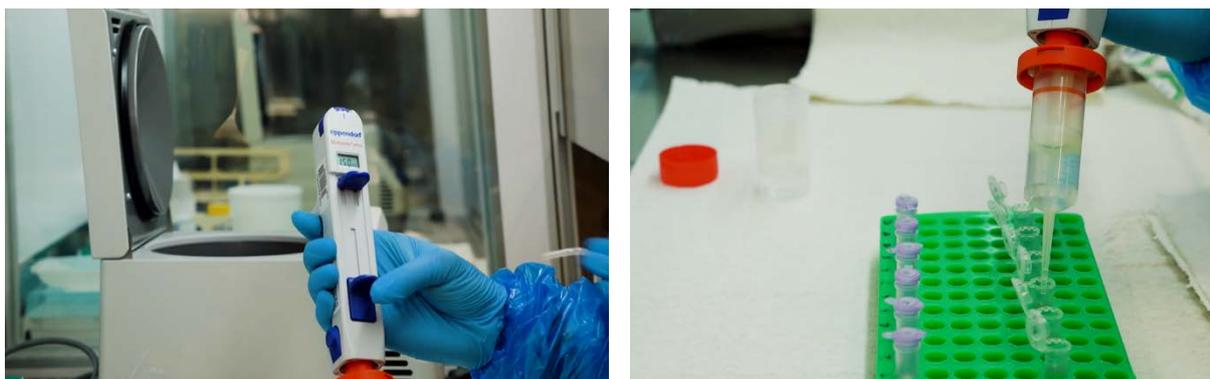


Imagen 57: Etapa de Unión, paso 3

4. Recuperamos los Millipore™ Amicon® Ultra-15 de la centrifuga y comprobamos que el volumen esta entre 300 y 450 microlitros. Aquí podemos encontrarnos con tres supuestos:
  - a) El volumen está por encima de la cantidad indicada.
    - **Solución:** Darle más tiempo en la centrifuga.
  - b) El volumen es menor de 300 microlitros.
    - **Solución:** Añadir agua ultra pura hasta completar esa cantidad, lo mismo si hablamos del control negativo.
  - c) El volumen esta entre el rango de los 300 a 450 microlitros. Pasamos al siguiente paso.

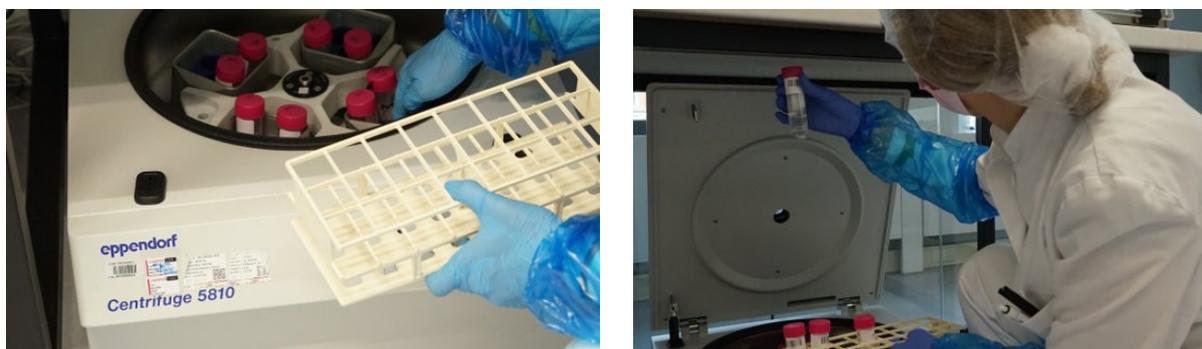


Imagen 58: Etapa de Unión, paso 4

5. Con una pipeta P-200 vamos recogiendo el concentrado de nuestro Millipore™ Amicon® Ultra-15 y lo transferimos directamente al tubo de 2 mL, donde previamente habíamos echado los 1.5 ml de PB Buffer. Puede emplear la misma punta hasta transferir todo el contenido concentrado del Amicon, una vez finalizada la transferencia, debe desechar la punta y pasar a la siguiente muestra. Recuerde hacerlo de uno en uno, para evitar las contaminaciones cruzadas y siempre limpie sus manos con la toalla o papel impregnado en lejía al 10%.
6. Repetimos la operación de trasvase tantas veces como muestras tengamos.



Imagen 59: Etapa de Unión, paso 5

7. Mezcle el lisado concentrado con el PB Buffer invirtiendo el tubo varias veces a o bien con un pequeño golpe de vortex.



Imagen 60: Etapa de Unión, paso 7

8. Este sería otro Punto de verificación:

**IMPORTANTE:** Cada vez que transferimos la muestra de un tubo a otro, debemos hacer que un operador externo compruebe que todo continua en el orden que debe estar. En este punto, el operador externo, debe verificar también que hemos transferido todo el lisado concentrado desde el Amicon a nuestro tubo de 2 mL.

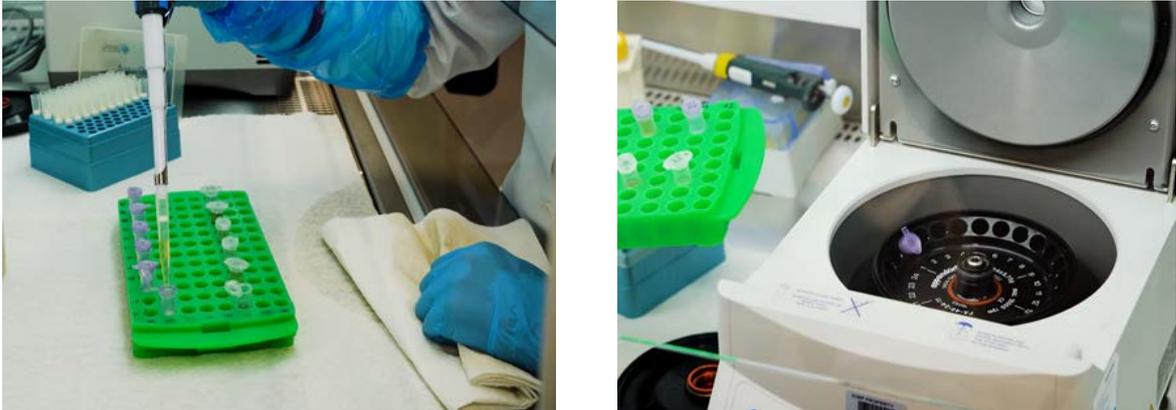


Imagen 61: Etapa de Unión, paso 8

9. Una vez hemos transferido el lisado de todas las muestras a los tubos de 2mL, les damos un pequeño golpe de centrifuga a 13000 rpm. Con ello eliminaremos las posibles gotas

que hayan podido quedar en la tapadera y así evitaremos salpicaduras cuando abramos los tubos la próxima vez.

10. Sacamos los tubos de 2mL de la centrifuga y los colocamos nuevamente en la gradilla, donde tenemos también las columnas QIAquick preparadas.
11. A continuación, transferimos desde los tubos de 2mL, que contienen el lisado y el buffer de unión, 650 microlitros a la columna de QIAquick correspondiente, y colocamos dichas columnas, con sus correspondientes tubos de recolección, dentro de la centrifuga 5424.



*Imagen 62: Etapa de Unión, paso 10 y 11*

12. Centrifugamos durante 60 segundos a 13000 rpm. Dejamos un pocillo o varios libres, en función del número de muestras, en la centrifuga, para así minimizar los riesgos de contaminación cruzada.
13. Repetimos este punto hasta que haya pasado completamente todo el contenido de nuestro tubo de 2mL a través de la columna de centrifugación QIAquick. Normalmente lo repetimos hasta en tres ocasiones, vaciando cada vez el líquido que está contenido en el tubo de recolección. Usaremos una toalla o papel empapado en lejía al 10%, colocado cerca del contenedor de residuos, para limpiar el líquido que pudiera gotear del tubo de recolección antes de volver a meter la columna para la siguiente centrifugación.



*Imagen 63: Etapa de Unión, paso 12 y 13*

14. Después de centrifugar colocamos los tubos en la gradilla. Ahora, todo el volumen ha pasado a través de la membrana y el ADN estará unido a la misma.
15. Las condiciones de pH en el lisado aseguran que las proteínas y otros contaminantes que puedan inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas, no sean retenidos en la membrana.
16. Como se ha producido una nueva transferencia desde los tubos de 2mL a las columnas de centrifugación QIAquick, debemos hacer que un operador compruebe que todo continua en el orden que debe estar.

*Para ahondar en el Purificación de ADN utilizando las Columnas de centrifugación QIAquick, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*

*Para acceder al video de forma digital, dirjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/649615858/03fe3dfdee>*



## Etapa de lavado

Entramos ahora en otra parte importante del proceso, la etapa de lavado. En esta etapa conseguiremos eliminar todas las sustancias tales como inhibidores, proteínas solubles, carbohidratos, etc, sin perder el ADN unido a la membrana.

1. El kit comercial que estamos usando de QIAgen, proporciona el Buffer requerido para esta etapa, llamado PE Buffer, pero este se presenta como buffer concentrado, por lo que debemos diluirlo previamente a su uso, para ello utilizaremos Etanol absoluto o al 96%, nunca alcohol desnaturalizado.



Imagen 64: Etapa de lavado, paso 1

2. Se deben agregar 400 ml de etanol absoluto o al 96% a 100 ml de tampón PE concentrado. Como sabemos, El ADN es insoluble en etanol, lo que permitirá que permanezca unido a la sílice, mientras que el resto de elementos que deben ser eliminados se solubilizan en el etanol y se eliminan.
3. El tampón PE diluido se puede almacenar a temperatura ambiente y debemos marcar en la botella que el etanol ya ha sido añadido, para que la próxima vez que usemos dicho tampón PE, no haya ninguna duda sobre si el etanol se agregó o no.
4. Use una pipeta de 1000 microlitros para añadir 750 microlitros de PE buffer diluido a cada columna de centrifugación QIAquick. Como siempre debemos hacerlo de uno en uno, y limpiando las manos cada vez, antes de pasar a la siguiente muestra.



*Imagen 65: Etapa de lavado, paso 4*

5. Colóquelos en la centrifuga 5424 y de un pulso de 60 segundos a 13000rpm. Deje como siempre un pocillo vacío entre cada muestra.



*Imagen 66: Etapa de lavado, paso 5*

6. Deseche el líquido sobrante de cada muestra en el contenedor de residuos. Use la toalla o papel empapado en lejía comercial al 10% que previamente hemos colocado cerca del contenedor de residuos, para limpiar la última gota de líquido que haya podido caer del tubo de recolección al vaciar su contenido.

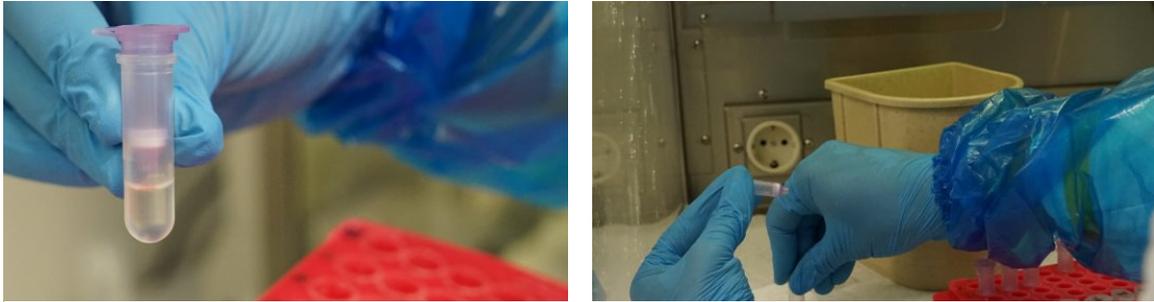


Imagen 67: Etapa de lavado, paso 6

7. Este proceso debemos repetirlo hasta en tres ocasiones, para lavar bien toda la muestra, es decir, necesitaremos añadir hasta en tres ocasiones 750 microlitros de PE buffer diluido, repitiendo en cada paso el proceso de centrifugación, y descarte del líquido contenido en el tubo de recolección, que es donde estarán todas las sustancias que deben ser eliminadas.
8. Después del tercer lavado con PE y para asegurarse que la columna está completamente seca, y no queda nada de etanol, que podría afectar posteriormente a la PCR, coloque los tubos nuevamente en la centrifuga 5424, y da un pulso de 3 minutos a 13000 rpm, como siempre no olvide dejar por lo menos un pocillo libre entre cada muestra.
9. Saque las columnas QIAquick de la centrifuga y colóquelas nuevamente en la gradilla, ahora saque la columna del tubo de recolección, y deposítela en el tubo de 1.5 mL que habíamos preparado y rotulado previamente, recuerde, de uno en uno, y limpiando sus manos cada vez con una toalla o papel empapado en lejía al 10%.



Imagen 68: Etapa de lavado, paso 9

10. Antes de pasar al siguiente punto, como ha llevado a cabo una transferencia de muestra, debemos verificar que todo continua en el orden establecido.

## Etapa de Elución

En esta última etapa del proceso queremos que el ADN contenido en la membrana de la columna QIAquick se libere de la misma y así recogerlo en nuestro tubo final de 1.5 mL. Para ello veremos cada uno de los pasos que requiere esta etapa.

1. En primer lugar, añadimos 50 microlitros de EB buffer a cada columna QIAquick, es extremadamente importante asegurarse que el Buffer cae en el centro de la membrana de la columna QIAquick, evitando, eso sí, tocar la membrana con la punta. Deje actuar durante un minuto.



Imagen 69: Etapa de elución, paso 1

2. Centrifugue el sistema columna/tubo en la centrifuga 5424 durante 1 minuto a 13000 rpm. Coloque las tapas de los tubos de 1,5 ml mirando hacia el centro de la centrífuga para reducir el riesgo de rotura de las mismas, y deje al menos un pocillo vacío entre cada muestra.



Imagen 70: Etapa de elución, paso 2

3. Si la tapa del tubo etiquetado de 1,5 ml se rompe durante el proceso de centrifugación, deberá etiquetar un nuevo tubo de 1,5 ml, transferir los 50 microlitros del eludido al nuevo tubo, y hacer que un operador independiente compruebe que el identificador de muestra en el tubo roto de 1,5 ml, y el nuevo tubo de 1,5 ml coinciden.

4. Sáquelos de la centrifuga, colóquelos en la gradilla, compruebe visualmente que cada tubo contiene aproximadamente 50 microlitros de extracto de ADN antes de tirar la columna QIAquick, después cierre el tubo.



Imagen 71: Etapa de elución, paso 4

5. Si no hubiera pasado todo el contenido del filtro de la columna QIAquick, deberá darle otro golpe de centrifuga, un minuto a 13000 rpm.
6. Una vez tengamos los 50 microlitros necesarios, depositaremos nuestros tubos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un frigorífico del cuarto de PCR.

*Para ahondar en el Protocolo de extracción de ADN de ICMP – Purificación con QIAquick, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*



*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652538365>*

## Purificaciones Adicionales

Después de la cuantificación de los extractos de ADN los valores de umbral analítico para el IPC serán evaluados para poder detectar una posible presencia de inhibidores de la PCR. Si se determina que el extracto de ADN contiene inhibidores, ésta muestra deberá ser purificada nuevamente antes de continuar con la marcha analítica.

Proceso de Purificación adicional:

1. Añada 250 microlitros de PB Buffer a cada extracto de ADN, mezcle ese Pb Buffer y el extracto de ADN varias veces o voltéelo durante 5 o 10 segundos.
2. Transfiera cada muestra de PB buffer y extracto de ADN a un tubo de columna QIAquick previamente etiquetado.
3. Coloque cada tubo en la centrifuga de 5424 y dele un pulso de 60 segundos a 13000rpm, deje como siempre un hueco entre cada muestra.

4. Cuando ya tenga todos los tubos centrifugados deseche el líquido sobrante en el bote para residuos.
5. Con una pipeta de 1000 microlitros, añada 750 microlitros de PE Buffer diluido en cada columna, ponga las columnas en la centrifuga y de un pulso de sesenta segundos a 13000 rpm.
6. Después sáquelo de la centrifuga, tire el líquido. Repetiremos esta operación un total de dos veces más.
7. Para asegurarse que la columna está completamente seca coloque todos los tubos nuevamente en la centrifuga y de un nuevo pulso de tres minutos a 13000 rpm.
8. Después transfiera la columna QIAquick a un nuevo tubo de 1.5 mL perfectamente rotulado.
9. Añada 50 microlitros de Buffer EB directamente al centro de la membrana, evitando tocar con la punta la membrana y coloque las columnas contenidas en el tubo de 1.5 mL dentro de la centrifuga 5424 y dele un pulso de 60 segundos a 13000rpm.
10. Compruebe que cada tubo contiene aproximadamente 50 microlitros de extracto de ADN antes de tirar el filtro y después cierre el tubo.
11. Déjelos todos en el congelador del cuarto de PCR a -20°C.

# **MÓDULO 4**

**PROTOCOLO AUTOMATIZADO  
DE EXTRACCIÓN DE ADN,  
MEDIANTE EL QIACUBE DE  
QIAGEN, POR DE  
DESMINERALIZACIÓN  
COMPLETA DE HUESOS Y  
DIENTES**



## MÓDULO 4. Protocolo automatizado de extracción de ADN – QIAcube

El equipo QIAcube no es más que una estación de trabajo robótica para la purificación automatizada de ADN, ARN o proteínas mediante los kits de columnas de centrifugación de la casa QIAGEN. Por ello comenzaremos la explicación de este protocolo<sup>43</sup>, a partir del punto en el que el lisado ya ha sido concentrado, ya que los pasos de desmineralización y la concentración del lisado usando los filtros Millipore™ Amicon® Ultra-15 son idénticos.



Imagen 72: Protocolo Automatizado QIAcube, equipo

### 4.1 Preparación del equipo QIAcube para cargar las muestras:

1. Lo primero que debemos hacer es esterilizar todo el material que vamos a utilizar, tubos de 2mL, tubos de 1.5 mL, adaptadores de rotor de plástico, la gradilla del adaptador de rotor de plástico, la gradilla del agitador y una alícuota de agua ultra pura, para ello utilizaremos el equipo de radiación UV y lo dejaremos actuar durante 30 minutos.



Imagen 74: Protocolo Automatizado QIAcube, material a utilizar

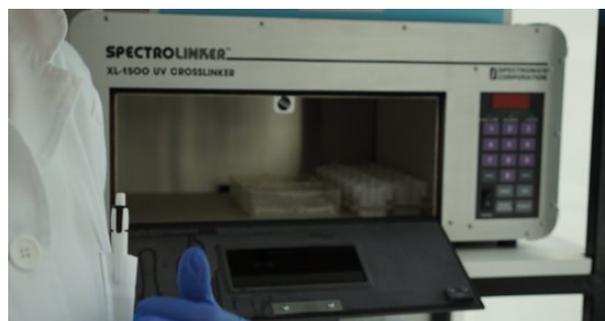


Imagen 73: Protocolo Automatizado QIAcube, equipo de radiación UV

<sup>43</sup> ICMP, "Standard operating procedure for DNA extraction from skeletal remains using the QIAGEN's QIAcube platform", ICMP.SOP.LS.93.9.doc.

2. Rotule los tubos de 2 ml, los tubos de 1,5 ml y las columnas QIAquick con los identificadores de muestra, igual que hicimos en el proceso manual.
3. A continuación, sacamos los Millipore™ Amicon® Ultra-15 que contienen el lisado concentrado, acuérdesse del volumen que tenemos que tener, de 300 a 450 microlitros, y ahora vamos a ir transfiriendo con ayuda de una pipeta de 200 microlitros, el lisado concentrado a los tubos donde previamente habremos añadido los 1.5 ml de Buffer de unión o PB Buffer.



Imagen 75: Protocolo Automatizado QIAcube, transferencia del lisado

4. Agitamos suavemente cada uno de los tubos, para que ambos elementos se mezclen perfectamente y continuamos con el resto de tubos.
5. Recuerde limpiarse las manos entre cada muestra para evitar la contaminación cruzada. Una vez transferido todo el lisado de cada muestra, debemos hacer nuestra verificación del proceso mediante un operador externo.

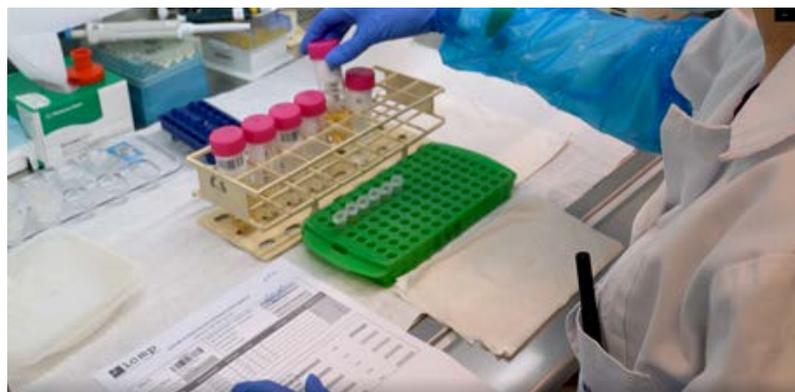
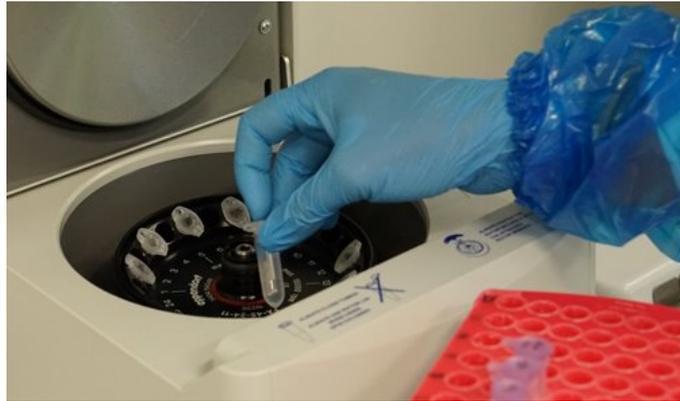


Imagen 76: Protocolo Automatizado QIAcube, verificación del proceso – witnesscheck

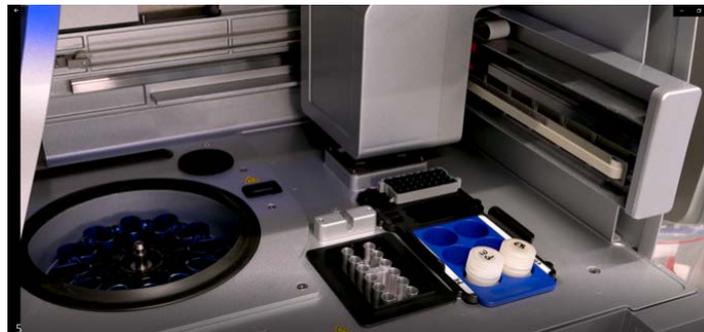
6. Una vez comprobado que todo está correcto, coloque los tubos dentro de la centrifuga 5424 y centrifúguelo durante 60 segundos a 13000 rpm. Deje, como ya hemos mencionado en alguna ocasión, un pocillo o varios libres, en función del número de muestras que este procesando, para minimizar los riesgos de contaminación cruzada.
7. A continuación, vamos a pasar a preparar el equipo QIAcube. Encienda el equipo para que comience a ejecutarse el programa de inicialización.

8.



*Imagen 77: Protocolo Automatizado QIAcube, centrifugación*

9. Cargue los reactivos necesarios, que en este caso son los Buffers PE y EB y colóquelos en las posiciones habilitadas para ello, no olvide quitar las tapaderas. \* Recuerde diluir el tampón de PE concentrado con etanol al 100% si aún no lo ha hecho.



*Imagen 78: Protocolo Automatizado QIAcube, preparación*

10. Cargue también las puntas de 1000  $\mu$ L. Asegúrese de poner tantas puntas como muestras vayan a ser procesadas.
11. Cargue los adaptadores del rotor con las columnas QIAquick y los tubos de elución de 1,5 ml.



*Imagen 79: Protocolo Automatizado QIAcube, carga de los adaptadores del rotor*

- 12.** Coloque las columnas QIAquick en la ubicación 1 del adaptador del rotor con la tapa en la posición L1. Los tubos de elución de 1,5 ml se colocan en la ubicación 3 del adaptador del rotor, con la tapa en la posición L3. Si está procesando menos de 12 muestras, debe consultar el cuadro de carga de QIAcube para asegurarse que el QIAcube se carga de forma equilibrada.



*Imagen 80: Protocolo Automatizado QIAcube, orden de las columnas*

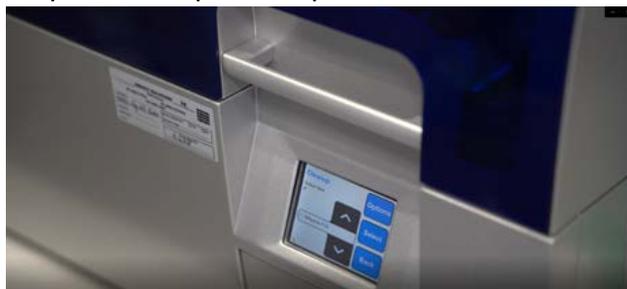
- 13.** Realizamos una verificación de testigos para asegurarnos que se colocan las columnas QIAquick y los tubos de elución de 1,5 ml de manera correcta en cada adaptador del rotor y que los adaptadores de rotor se colocan correctamente dentro del rotor QIAcube, todo ello de acuerdo con la documentación de procesamiento.

- 14.** Ahora coloque en la gradilla del agitador del QIAcube, las muestras, es decir, los tubos de 2 mL que contienen las muestras con el Buffer de unión.



*Imagen 81: Protocolo Automatizado QIAcube, muestras*

- 15.** Se realiza una verificación de testigos independiente para garantizar que los tubos de 2 ml se transfieran a las posiciones correctas en la gradilla del agitador. Una vez que la gradilla del agitador se haya cargado correctamente, debe colocarse en el QIAcube con el primer tubo en la posición superior izquierda.



*Imagen 82: Protocolo Automatizado QIAcube, interfaz*

#### MÓDULO 4. PROTOCOLO AUTOMATIZADO DE EXTRACCIÓN DE ADN - QIACUBE

16. Utilice la interfaz del instrumento para navegar y seleccionar el protocolo Cleanup correcto para muestras de 1800 microlitros. Después presione iniciar para comenzar el protocolo.
17. Para el procesado de 12 muestras, el equipo QIAcube tardará aproximadamente 1 hora.
18. Pasado este tiempo que podrá ser mayor o menor en función del número de muestras a procesar, verá como el equipo muestra un mensaje en el display donde dice que el proceso ha finalizado.
19. Retire los adaptadores del rotor QIAcube y compruebe que todo el contenido de las columnas QIAquick se hayan transferido y pasado a los tubos de elución, y que haya aproximadamente 50 microlitros de extracto de ADN en cada tubo de elución.



*Imagen 83: Protocolo Automatizado QIAcube, comprobación transferencia del contenido*

20. Si es así, deseche las columnas QIAquick y cierre las tapas de los tubos de elución de 1,5 ml.
21. Apague el equipo QIAcube y retire todos los reactivos y puntas sobrantes.
22. Las puntas sobrantes, los tubos de 2 ml y los adaptadores de rotor se pueden desechar.
23. Guarde el extracto de ADN obtenido a  $-20^{\circ}$ .

*Para ahondar en el proceso con el QIAcube, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*



*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652541437>*



# **MÓDULO 5**

**PROTOCOLO DABNEY DE  
EXTRACCIÓN DE ADN,  
ADAPTADO POR ICMP**



## MÓDULO 5.

### Protocolo Dabney de extracción de ADN, adaptado por ICMP

El protocolo Dabney fue desarrollado en 2013 [20] por Jesse Dabney y sus colaboradores (*J. Dabney et al, 2013, Proceedings of the National Academy of Sciences Of the United States of America*) para extraer ADN antiguo. La superioridad del protocolo Dabney yace en que incrementa el rendimiento del ADN por gramo de polvo de hueso, por lo que pueden obtenerse los mismos resultados con menos polvo de hueso. El menor uso posible de polvo de hueso es importante sobre todo para casos en los que se encuentran cantidades de restos sumamente pequeñas, como en México.

Este Protocolo ha sido adaptado por ICMP<sup>44</sup> y consiste en la completa desmineralización del polvo obtenido de huesos y dientes gracias a una serie de pasos, como la digestión enzimática del polvo de hueso durante la noche a 56°C, seguida de una absorción del ADN a una columna con membrana de sílice donde el ADN queda primero atrapado para ser después diluido y liberado con una solución tamponada. Luego se selecciona la parte del genoma que nos interesa por medio de la PCR y llegamos a la obtención de nuestro perfil genético. Último punto de nuestro trabajo.

Para ello comenzaremos mostrando como preparamos cada uno de los Buffers que son imprescindibles para llevar a cabo este protocolo. Buffer de Extracción o Desmineralización y Buffer de Unión.

Los buffers requeridos para el protocolo Dabney se elaboran en el laboratorio antes de cada uso y sus volúmenes varían en base a la cantidad de polvo de hueso que vamos a procesar, normalmente llevaremos a cabo múltiplos de 50 mg de polvo de hueso.

En las siguientes tablas se muestran cada uno de los componentes que forman el buffer de extracción y de unión, con las cantidades requeridas de cada reactivo en función de la cantidad de polvo de hueso que vayamos a procesar por muestra.

Componentes del Buffer de extracción	Cantidad para 50 mg de polvo de hueso en microlitros	Cantidad para 100 mg de polvo de hueso en microlitros	Cantidad para 200 mg de polvo de hueso en microlitros
Agua	74.5 (µL)	149 (µL)	298 (µL)
0.5M EDTA, pH 8.0	900 (µL)	1800 (µL)	3600 (µL)
Tween-20, 0.0005%	0.5 (µL)	1 (µL)	2 (µL)
Proteinasa K, 10mg/mL	25 (µL)	50 (µL)	100 (µL)

Tabla 4: Componentes del Buffer de extracción por muestra

<sup>44</sup> J.Dabney et al, 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

Componentes del Buffer de unión	Por 50 mg de polvo de hueso	Por 100 mg de polvo de hueso	Por 200 mg de polvo de hueso
Clorhidrato de Guanidina	Pesar 4.776 g	Pesar 9.552 g	Pesar 19.104 g
Agua	Rellenar hasta 6 mL	Rellenar hasta 12mL	Rellenar hasta 24 mL
Isopropanol	Rellenar hasta 10 mL	Rellenar hasta 20 mL	Rellenar hasta 40 mL
Tween-20, 0.0005%	Añadir 5 microlitros	Añadir 10 microlitros	Añadir 20 microlitros

Tabla 5: Componentes del Buffer de unión por muestra

## 5.1. Preparación del Buffer de extracción

Los componentes y las concentraciones que son necesarios para preparar nuestro Buffer de extracción o desmineralización son los siguientes: EDTA 0,45 M, Tween-20 y una solución de proteinasa K 0.25 mg / ml. Estas son las concentraciones finales de cada reactivo en el tampón de extracción.

Para diluir el EDTA a la concentración requerida añadiremos agua ultra pura.

Es aconsejable preparar el tampón de extracción el día que lo vayamos a usar, pero podríamos tenerlo preparado días antes, ya que puede almacenarse durante días a temperatura ambiente, siempre y cuando, no hayamos añadido todavía la solución de proteinasa K.

Se utiliza 1 ml de tampón de extracción por cada 50 mg de polvo de hueso que vayamos a procesar.

1. Para hacer el tampón de extracción, necesitamos usar una solución de Proteinasa K con una concentración de 10 mg / mL.

Se recomienda preparar alícuotas de proteinasa K para poder usarse en cada proceso de extracción, sin tener que prepararlas cada vez, ya que dichas alícuotas pueden ser almacenadas sin problemas en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Solo debemos recordar sacarlas cuando vayamos a empezar el proceso de extracción, así cuando llegue el momento de usarlas estarán perfectamente atemperadas.

2. Para preparar la proteinasa K a la concentración requerida de 10 mg / mL, usaremos un tubo falcon donde echaremos los 100 mg de proteinasa K en polvo, y los 10 ml de agua ultra pura, los mezclaremos hasta que toda la proteinasa K este perfectamente disuelta en el agua ultra pura.



*Imagen 84: Dabney, preparación Proteinasa K*

3. El siguiente paso es preparar el tampón de extracción. Mida el volumen calculado de EDTA 0,5 M en una botella u otro recipiente de tamaño adecuado. Agregue el volumen requerido de agua y luego el Tween-20. Tenga cuidado al pipetear Tween-20, ya que es muy viscoso, por lo que podríamos no añadir el volumen correcto.



*Imagen 85: Dabney, preparación tampón de extracción*

4. El siguiente paso es agregar la solución de proteinasa K 10 mg / ml.
5. Una vez que se hayan añadido todos los componentes, agite el Buffer cuidadosamente. Tenga en cuenta que el Tween-20 es un detergente, por lo que hará que el tampón forme espuma cuando se mezcle.
6. Selle el recipiente con parafina para evitar la posible evaporación.

## 5.2. Preparación del Buffer de unión

Al día siguiente, mientras las muestras permanecen en el horno, preparamos el buffer de unión. Este Buffer debería prepararse el mismo día que va a ser utilizado.

- Los componentes del Buffer de unión son los siguientes:
  - Clorhidrato de Guanidina 5M
  - Tween-20. 0.0005%
  - Isopropanol 40%
  - Acetato de Sodio 3 M, pH 5.2
  - Agua ultra pura para alcanzar la concentración correcta de todos los componentes del tampón.
1. Utilice un recipiente adecuado para preparar el Buffer de unión.
  2. Comenzaremos el proceso pesando la cantidad de polvo de Clorhidrato de Guanidina requerido. Viértalo con cuidado en el recipiente.



*Imagen 86: Dabney, polvo de Clorhidrato de Guanidina*

3. Tenga cuidado al añadir el agua, hágalo lentamente para que el polvo de guanidina esté completamente cubierto y comience a disolverse, de lo contrario, puede agregar más agua de la necesaria.



*Imagen 87: Dabney, agua en el Clorhidrato de Guanidina*

4. A continuación, agregue el volumen requerido de isopropanol,



Imagen 88: Dabney, isopropanol

5. Por último, agregue el Tween-20, teniendo en cuenta lo ya mencionado anteriormente, debe ser preciso en el pipeteo, de lo contrario debido a su viscosidad, podría no añadir el volumen correcto.



Imagen 89: Dabney, Tween-20

6. A continuación, ponga toda la mezcla en la plataforma de agitación a una temperatura entre 30-35°C, y déjelo ahí hasta que la solución este transparente. Se estima un tiempo aproximado no inferior a una hora.



Imagen 90: Dabney, mezcla en la plataforma de agitación

7. Una vez que el clorhidrato de guanidina está completamente disuelto, y por tanto el buffer de unión esta transparente, alicuotamos unos 10 mL de este buffer de unión, en tantos tubos falcon de 50 mL, como muestras tengamos para extraer, contando como siempre con el tubo de extracción negativa, y los rotulamos. El resto de Buffer de unión podemos reservarlo para la siguiente extracción.
8. Utilizaremos 10mL de Buffer de unión por cada 50 mg de polvo de hueso.

*Para ahondar en el Preparación de reactivos para el protocolo adaptado de Dabney, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*



*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652543683>*

### 5.3. Preparación de las muestras y proceso de desmineralización

Días previos al proceso de extracción, habremos preparado las muestras que vamos a procesar, es decir, habremos pesado la cantidad de polvo de hueso necesaria para llevar a cabo el protocolo, esta cantidad de polvo de hueso puede ir desde los 50 mg hasta los 200 mg. Dejaremos nuestro conjunto de muestras perfectamente etiquetadas en el congelador a la espera de ser procesadas.

1. El día de la extracción saque del congelador o frigorífico las muestras de polvo de hueso que preparó y colóquelas en la campana de trabajo.



Imagen 91: Dabney, muestras de polvo de hueso

2. Una vez en la campana, deberán ser verificadas por un operador externo, a fin de comprobar que son las mismas que están en la hoja de laboratorio, así como que la posición en la gradilla es la correcta.

**IMPORTANTE:** Recuerde que el volumen de Buffer de extracción y de unión requerido está directamente relacionado con la cantidad de polvo de hueso que vaya a procesar.

3. Si la cantidad de polvo de hueso que preparamos fue de 50 mg, deberemos añadir 1mL de Buffer de extracción a cada muestra, con cuidado y recordando que debemos limpiar nuestras manos cada vez que procesamos una muestra. Una vez añadido el Buffer de extracción a cada muestra, ya tenemos lista nuestra gradilla para el siguiente paso.
4. Asegúrese siempre de cerrar completamente el tubo, y ponga parafina alrededor de la tapadera, todo ello evitara posibles derramamientos durante el proceso de incubación en el horno.
5. Una vez sellado y antes de ponerlo en la bandeja del horno, agítelo suavemente de manera manual o en el vortex, para asegurarnos que el polvo de hueso se ha mezclado perfectamente con el buffer de extracción.



*Imagen 92: Dabney, mezcla polvo de hueso con el buffer de extracción*

6. Coloque cada tubo en la plataforma de agitación que está dentro del horno, ciérrelo y compruebe que el mismo está a una temperatura de 56°C. Déjelo incubar durante al menos 12 horas, pero no más de 48 horas. En ICMP las muestras se dejan en el horno durante toda la noche.



*Imagen 93: Dabney, incubación de las muestras*

*Para ahondar en el Pasos de desmineralización del protocolo Dabney, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*

*Para acceder al video de forma digital, dirjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652547444>*



## 5.4. Unión del lisado al Buffer PB

El protocolo de extracción de ADN de Dabney adaptado de ICMP utiliza las columnas de purificación MinElute de QIAGEN, las cuales se insertarán en un reservorio y todo ello dentro de uno tubo falcon, por ello todo, este material debe ser previamente esterilizado durante 30 minutos en el equipo de radiación ultravioleta.

Para esta parte del protocolo de Dabney adaptado de ICMP, se requieren distintos Buffers, incluido el tampón o buffer de unión que preparamos anteriormente. También usaremos los Buffers de QIAGEN: Buffer PE y Buffer EB.

El tampón o Buffer PE se utiliza para lavar la muestra y así conseguir eliminar los restos celulares e inhibidores, y el tampón o Buffer EB eluye el ADN que este contenido en la membrana de la columna y así recuperar el extracto de ADN puro.

Como vimos en el apartado 2, por cada 50 miligramos de polvo de hueso, se deben preparar alícuotas de 10 ml de tampón de unión en tubos falcon de 50 ml esterilizados y etiquetados con su identificador de muestra.

1. Ahora, se añaden en cada tubo falcon de 50 mL, donde previamente habíamos pipeteado 10 ml de tampón de unión, 400 microlitros de acetato de sodio 3 M, pH 5,2.

De esta forma se garantiza que se produzca el entorno de pH correcto para la unión del ADN a la membrana de sílice. Este es un volumen relativamente grande de tampón de unión y ello es importante para mejorar la eficiencia de la unión del ADN a la columna MinElute.

Debido al gran volumen de lisado mezclado con tampón de unión que debe pasar a través de la columna MinElute, se utiliza un depósito reservorio Zymo, capaz de contener hasta 15 ml, lo que ayuda a minimizar el número de pasos de pipeteo necesarios.

2. El depósito Zymo debe ensamblarse con la columna de purificación MinElute, para poder llevar a cabo el proceso de purificación [30].



Imagen 94: Dabney, embalaje para el proceso de purificación

**IMPORTANTE:** Asegúrese de que ambos dispositivos hayan encajado con suficiente fuerza para que el conjunto no se mueva durante el proceso de centrifugación.

3. Todo el sistema unido, se coloca dentro de un tubo falcon limpio de 50 ml previamente etiquetado. **NO** olvide rotular la tapadera de cada columna MinElute con su identificador de muestra.



*Imagen 96: Dabney, columna debidamente rotulada*



*Imagen 95: Dabney, sistema unido dentro del tubo falcon*

4. Haga cuatro marcas alrededor del tubo falcon a modo de líneas verticales (I, II, III, IV) separadas cada una de ellas un giro de 90°, veremos su utilidad durante los pasos de centrifugación posteriores, cuando usemos cantidades de polvo de hueso superiores a 50 mg.



*Imagen 97: Dabney, marcas alrededor del tubo falcon*

5. Coloque los tubos falcon, en cuyo interior tienen el ensamblado Zymo-columna MinElute, en una gradilla. Los utilizaremos a continuación para hacer pasar a través del mencionado sistema, todo el lisado obtenido tras la incubación.

## Unión a la Columna de elución

1. Recupere las muestras del horno. Tome nota si alguna muestra se ha derramado. Apague el horno y asegúrese que todo el polvo de hueso ha sido digerido correctamente.
2. Puede observar como el lisado a veces presenta diferentes colores, esto es debido a su calidad, el estado de degradación de la muestra, el tipo de suelo donde estuvo, etc. Después de haber revisado las muestras, limpie cuidadosamente cada tubo con una toalla o papel empapado en lejía 10% y colóquelos en una gradilla de tubos limpia.



*Imagen 98: Dabney, diferentes colores del lisado*

3. Coloque los tubos en el interior de la centrifuga y centrifugue los tubos durante cinco minutos a 3000 rpm, de esta manera nos aseguramos que ningún resto de polvo de hueso se ha quedado en el fondo del tubo.
4. Quite el papel de parafina que ha usado para sellar cada tubo, siendo muy cuidadosos para que no se abran las tapaderas.
5. Transfiera todo el lisado al tubo falcon de 50 mL, en el que previamente habíamos añadido el buffer de unión. Recuerde que hay que hacerlo de uno en uno y limpiando nuestras manos con la toalla empapada en lejía comercial al 10% cada vez.



*Imagen 99: Dabney, tranferencia del lisado al tubo falcon*

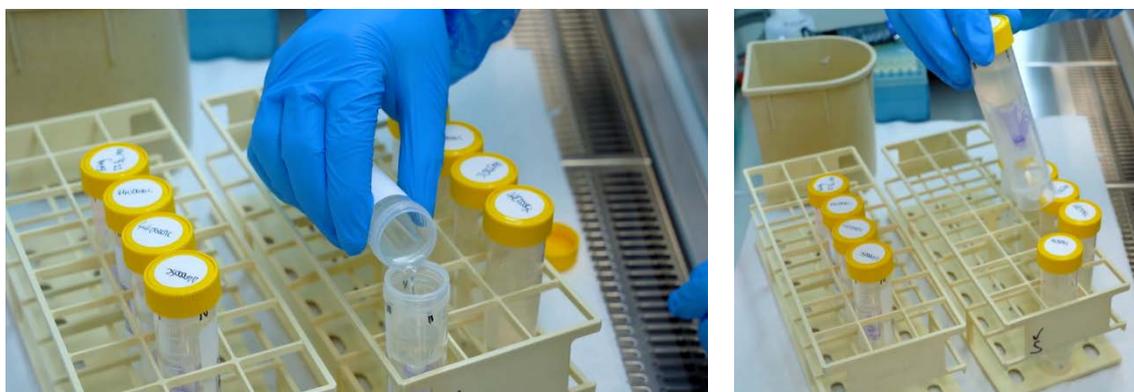
**NOTA:** Sea cuidadoso si hay algún resto de polvo de hueso. Cualquier resto de polvo probablemente obstruiría el filtro de la columna de elución, incrementando los tiempos de centrifugación y probablemente reduciendo la eficacia de la unión. Sería necesario transferir algo menos de 1 mL de lisado.

6. Invierta cada muestra para que se mezclen correctamente.



*Imagen 100: Dabney, muestras invertidas*

7. Vierta hasta 15 mL del volumen del lisado-buffer de unión en el reservorio Zymo-columna minElute previamente preparado. Si transfiere más volumen este podría entrar en contacto con membrana de la columna MinElute tras la centrifugación.



*Imagen 101: Dabney, mezcla del buffer de unión*

8. Una vez que todas las muestras han sido transferidas, las colocamos en la centrifuga y centrifugamos durante 4 minutos a 2000 rpm, con todos los tubos orientados con la línea I hacia el rotor.



Imagen 102: Dabney, centrifugación

9. Si utilizamos solo 50 mg de polvo de hueso en el inicio, solo se requerirá una única transferencia de lisado y por tanto un único golpe de centrifuga.
10. Si partimos de más de 50 mg de polvo de hueso, se requerirán varios pasos para transferir todo el lisado. Transfiriendo sobre 15 mL cada vez. En cada paso posterior de centrifuga, situaremos el tubo de tal manera, que las líneas II, después la III, y por último la IV, queden enfrentadas con la cara interna del rotor de la centrifuga y lo dejaremos centrifugar durante 2 minutos a 1500 rpm.



Imagen 103: Dabney, transferencia del lisado

**NOTA:** El líquido que ha pasado a través de la columna de filtrado, y se ha recogido en el falcon debe ser eliminado tras cada paso de centrifugación. Asegúrese que el desperdicio no toca el fondo del filtro de la columna en ningún momento.

11. Repita este proceso todas las veces que sean necesario hasta que todo el lisado haya pasado a través de la membrana de filtrado de la columna. La rapidez con la que gira puede incrementarse gradualmente si se necesita.

**NOTA:** El tampón de unión sobrante y el tampón de lisado residual contienen clorhidrato de Guanidina por lo que se deben desechar de manera separada

## 5.5. Proceso de Purificación

1. Una vez que todo el lisado ha pasado a través de la membrada de la columna MinElute, el sistema debería ser desensamblado y la columna colocada dentro de un tubo de 2mL de QIAGEN



Imagen 104: Dabney, desensalaje del sistema

2. Centrifugaremos el tubo MinElute a 6000 rpm, durante un minuto, para asegurarnos que el filtro está totalmente seco antes de continuar con los siguientes pasos de purificación.
3. Ahora comenzaremos el proceso de lavado de la muestra, para ello utilizaremos el PE Buffer. Este es suministrado por el fabricante como un tampón concentrado por lo que debemos diluirlo con etanol al 100% antes de usarlo. Se deben agregar 400 ml de etanol absoluto o etanol al 96 % a 100 ml de tampón PE concentrado.



Imagen 105: Dabney, proceso de lavado de la muestra

4. El etanol es un componente crítico del tampón para mantener el entorno químico correcto para que el ADN permanezca unido a la membrana durante los pasos de lavado. El tampón PE se puede almacenar a temperatura ambiente, pero debe marcarse en la botella, que el etanol ha sido añadido, para cuando se utilice nuevamente.
5. A continuación, con una pipeta P-1000 microlitros, añade 750 microlitros de buffer de lavado PE diluido a cada muestra. No olvide limpiar sus manos con una toalla empapada en lejía comercial al 10% entre muestras.

6. Coloque los tubos de MinElute en la centrifuga y centrifugue durante 1 minuto a 6000 rpm, de esta manera permitiremos que todo el buffer de elución pase a través y lave la membrana. Recuerde dejar un pocillo libre entre cada muestra para evitar las contaminaciones cruzadas.
7. Vacíe el sobrante en el contenedor de residuos. Tenga precaución y limpie la posible gota que pudiera gotear, del tubo donde se depositó el líquido tras la centrifugación, con la toalla empapada en lejía al 10%.
8. Repita el proceso con otros 750 microlitros de buffer de lavado PE diluido y centrifugue a 6000 rpm durante un minuto. Vacía nuevamente el líquido sobrante
9. Después del segundo lavado, centrifugue los tubos MinElute durante al menos un minuto a 13000 rpm para asegurarse que el filtro este seco, y no hay exceso de etanol que pudiera interferir en la etapa de PCR<sup>4546</sup>.
10. Vacíe el contenido en el contenedor de residuos.
11. Finalmente, transfiera cada columna MinElute del tubo de 2mL de recolección de QIAgen al tubo de 1.5 ml previamente rotulado.



Imagen 106: Dabney, transferencia de las columnas MinElute

12. En este punto, y antes de pasar al siguiente punto, debemos tener una verificación de testigo a fin de asegurar que todo ha sido transferido en el orden correcto y que el mismo sigue coincidiendo con muestra hoja de laboratorio.

*Para ahondar en el Purificación del Lisado en el protocolo de Dabney, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*

*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652548680>*



<sup>45</sup> Standard Operating Procedure for extraction of DNA from bones using Dabney Zymo-MinElute protocol.

<sup>46</sup> Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1939-1943.

## 5.6. Proceso de Elución

Ahora comenzaremos con el proceso de elución que no es otra cosa que sacar el ADN, ya libre de todos los componentes que no nos interesan, de la membrana donde este contenido. Para ello:

1. Dispense 25 microlitros de buffer de elución EB en el centro de la membrana. Sea cuidadoso para no tocar la membrana con la punta de la pipeta. Déjelo actuar a temperatura ambiente durante cinco minutos.

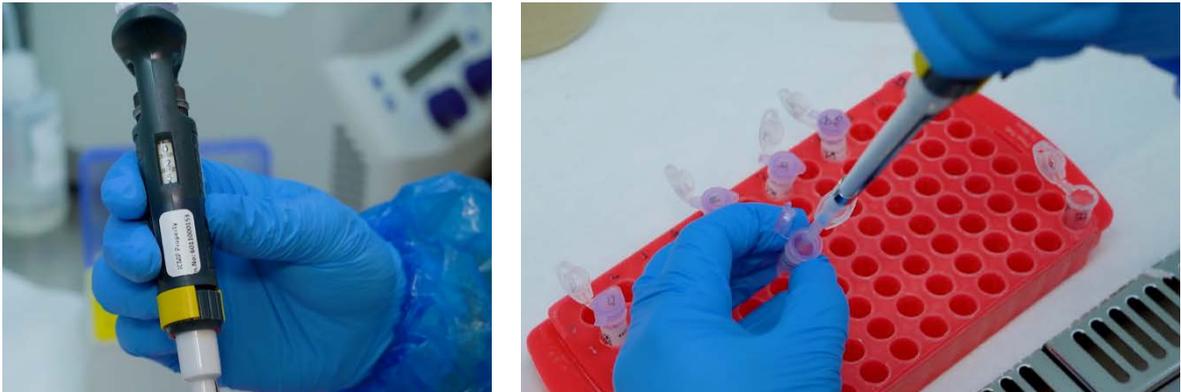


Imagen 107: Dabney, proceso de elución

2. Centrifugue a máxima potencia durante 30 segundos para eluir todo el ADN. Coloque las tapaderas de los tubos eppendorf de 1.5 ml mirando hacia el interior del rotor de la centrifuga, de este modo minimizaremos la posible rotura de las misma y deje como siempre un pocillo vacío entre las muestras para evitar las contaminaciones cruzadas.
3. Repita el paso de elución con otros 25 microlitros de buffer de elución. Macérela nuevamente a temperatura ambiente durante cinco minutos, después centrifugue a máxima revoluciones durante 30 segundos y recoja el eludido final.
4. Dicho eludido deberá tener un volumen de 50 microlitros antes de desechar la columna. En caso contrario deberá dar un nuevo golpe de centrifuga durante 60 segundo a 13000 rpm.



Imagen 108: Dabney, volumen del eludido

## MÓDULO 5. PROTOCOLO DABNEY DE EXTRACCIÓN DE ADN, ADAPTADO POR ICMP

5. Si la tapa del tubo etiquetado de 1,5 ml se rompe durante el proceso de centrifugación, deberá etiquetar un nuevo tubo de 1,5 ml, transferir los 50 microlitros del eludido al nuevo tubo, y hacer que un operador independiente compruebe que el identificador de muestra en el tubo roto de 1,5 ml, y el nuevo tubo de 1,5 ml coinciden.
6. Almacene el ADN puro extraído a -20°C.
7. Ahora ya tiene el extracto de ADN puro, y podrá pasar al siguiente punto para la obtención de un perfil genético susceptible de dar una identificación positiva.



# MÓDULO 6

TUTORÍA PARA LA VALIDACIÓN DE  
LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE  
ADN



## **Modulo 6.**

# **Tutoría para la validación de los métodos de extracción de ADN**

En el módulo 6, ICMP provee tutoría para la validación de los métodos de extracción de ADN. Dicha tutoría consiste en 80 horas de práctica y resulta en la preparación de los Protocolos a ser validados y de las prácticas necesarias para realizar posteriormente los experimentos de validación.



**RESPUESTAS A  
PREGUNTAS  
FRECUENTES**



## Respuestas a preguntas frecuentes

En este apartado se incluyen respuestas a las preguntas que surgen frecuentemente durante los ensayos de validación de los Protocolos

### **1. ¿Todas las muestras bajan a la misma velocidad en el proceso de centrifugación de los Amicon?**

No, los tubos que contienen muestras tendrán distintos tiempos de paso, ya que unas podrán tardar media hora, otras una hora o incluso dos. Todo ello dependerá de la composición de la propia muestra. De ahí que serán necesarios varios golpes de centrifuga hasta obtener el volumen requerido para el siguiente paso.

El control negativo de extracción, baja rápidamente, situándose entre los 300 y los 450 uL requeridos con el primer paso de centrifugación.

Si alguna de las muestras tiene un volumen menor al requerido, será necesario, añadir agua hasta alcanzar los 400 uL

### **2. En el protocolo Dabney, ¿Qué podemos hacer si se genera un vacío en las columnas MinElute que impide que la muestra siga pasando a su través?**

Cuando la muestra es centrifugada para que el ADN adherido a la membrana de sílice de la columna MinElute, pueda separarse del resto de componentes que no queremos que sean extraídos, se puede crear un vacío en el interior de la propia columna que hace que la muestra, aunque sea sometida a varios ciclos de centrifugación, no consiga bajar.

Este problema puede solventarse separando, con mucho cuidado, la columna MinElute del reservorio Zymo, consiguiendo que el aire generado en el interior salga y volviendo a unirlos para poder seguir con el paso de centrifugación.

Otro posible contratiempo es que el dispositivo Zymo-Columna MinElute debido al gran número de ciclos de centrifugación al que puede ser sometido, en función de las características de la muestra, es decir, porque la misma no baje y deba ser sometido hasta a dos horas de centrifugación, pueden llegar a separarse. Si esto ocurriera se debe tomar la columna MinElute, acoplarla a otro reservorio Zymo y verter todo el contenido nuevamente en el reservorio para continuar con los pasos de centrifugación.

No centrifugar a más de 1.500 r.p.m. en estos casos.

### 3. ¿Si no tenemos Tween-20, podemos usar SDS?

Sí, podemos usar SDS en su lugar sin ningún problema, ya que el Tween- 20 es también un detergente, pero lo importante es hacerlo a la misma concentración, es decir a 0.0005%.

**BREVE EXPLICACIÓN:** En el protocolo original de Dabney et. al. no se usa Tween-20 en el buffer de lisis, y en el Buffer de unión se usa al 0.05%.

En el protocolo de Rohland et. al. en el buffer de lisis se usa el Tween-20 al 0.0005% y al 0.05% en el Buffer de unión.

Nuestro protocolo adaptado usa el Tween-20 al 0.0005% en el Buffer de lisis y aproximadamente al 0.0005% en el Buffer de unión.

Así pues, el SDS se puede usar tanto al 0.05% o al 0.0005% o a un porcentaje intermedio.

Resumiendo, podemos decir que el uso tanto de SDS, Tween-20 o N-Laurilsarcosinato y su concentración no es un factor determinante, por lo menos para el tipo de muestras que manejamos en nuestros laboratorios.

### 4. ¿Si el buffer de unión en el protocolo Dabney ya está transparente, aunque todavía no haya pasado ni una hora, significa que ya puedo utilizarlo?

El buffer de unión se debe dejarse una hora mínimo en agitación, sin importar que antes de la hora ya esté completamente transparente. La práctica demuestra que menos de una hora hace que los componentes que lo conforman no se hayan mezclado correctamente.

Para comprobar que el buffer de unión está listo para ser usado, se puede sacar del agitador, esperar unos minutos y ver si se cristaliza. Si se cristaliza, se tendrá que dejar durante más tiempo, y si no se cristaliza ya se podrá utilizar.

### 5. ¿Cuál es el tiempo de pulverización en el TissueLyser más óptimo para obtener el diámetro de polvo de hueso más eficaz?

Ese tiempo rondaría entre los 45 segundos y un minuto. Dejarlo durante más tiempo hace que el polvo de hueso se convierta en un talco que hace muy difícil despegarlo de las paredes de las tazas del dispositivo TissueLyser, lo cual no solo hace que se pierda la muestra, sino que además no la pulverización adicional no tiene ningún impacto en mejorar los resultados de la extracción.

## RESPUESTAS A PREGUNTAS FRECUENTES

### 6. ¿Podemos usar otros dispositivos para el proceso de pulverizado?

Sí, se pueden emplear tanto batidoras comerciales, tal y como se indica en este manual, pulverizadores como Freezer/Mill® con nitrógeno líquido o cualquier otro pulverizador comercial.

### 7. ¿Cuántos Dalton tienen un par de bases?

Un par de bases tienen 650 Daltons.

### 8. ¿Qué rango de fragmentos dejan pasar las columnas Qiaquick?

Las columnas Qiaquick dejan pasar fragmentos de ADN de hasta 100 pb.

### 9. ¿Qué rango de fragmentos dejan pasar las columnas MinElute?

Las columnas MinElute dejan pasar fragmentos de ADN de hasta 70 pb.

### 10. ¿Qué rango de fragmentos dejan pasar los Amicon de 100kDA y los de 30kDA?

Los Amicon de 100kDA retienen partículas de ADN de hasta 150 pares de bases.

Los Amicon de 30 Kda retienen partículas de ADN de hasta 50 pares de bases.

### 11. ¿Solo podemos usar etanol al 100% (absoluto) para diluir el Buffer de lavado?

Si bien en el video explicativo del curso, se menciona que el etanol usado debía ser al 100%, sí es posible utilizar alcohol de 96%, ya que en los segundos posteriores a haber abierto el etanol la evaporación causa que el mismo ya no esté al 100%. Lo que de ninguna manera podemos usar es etanol desnaturalizado.

### 12. ¿Cuánto tiempo podemos almacenar la proteinasa K?

La proteinasa K tiene una vida útil de 12 meses si se almacena en un lugar seco a 4-8 °C, ya que es muy estable, teniendo además un amplio rango de pH.

### **13. ¿Se pueden utilizar columnas MinElute en lugar de las de QIAquick para el método estándar de ICMP?**

Sí, ambas columnas se basan en la misma técnica para atrapar el ADN, lo que las diferencia es el tamaño del fragmento de ADN que dejan pasar a través de su poro.

Normalmente se utilizarán las columnas Qiaquick con los Amicon de 100Kda y las columnas MinElute con los Amicon de 30Kda.

Los filtros Amicon de 100 KDA, tienen el corte de filtración en 150 pb, lo que significa que perdemos todos los fragmentos de ADN que estén por debajo de este número de pares de bases.

Las columnas QIAquick tienen su limitante de corte en 100pb lo que nos indica que retendrán en su membrana partículas de ADN por encima de este valor, es decir, fragmentos más pequeños se perderán.

Por ello, si se usa Amicon 100 kDA con columnas QIAquick, los fragmentos de ADN que tendremos al final, serán aquellos que tengan de alrededor de 150pb.

Por el contrario, si usamos Amicon 30kDA que tienen su corte en 50 pares de bases con columnas MinElute que lo tienen en 70 pares de bases, los fragmentos de ADN que se tendrá en nuestro extracto, serán todos aquellos que vayan desde tamaños alrededor de 70 pares de bases, o más. Por ello la mejor combinación posible cuando se procesan muestras muy fragmentadas será la combinación de Amicon 30kDA con columnas MinElute.

# REFERENCIAS



## Referencias

### Protocolos ICMP

- Standard operating procedure for Bone/Tooth Samples Washing and Grinding. (ICMP.SOP.DNA.31.3.doc);
- Standard operating procedure for Full Demineralization DNA Extraction from Skeletal Remains (ICMP.SOP.DNA.85.3.doc);
- Standard operating procedure for DNA Extraction from Skeletal Remains Using the Qiagen's Qiacube Platform (ICMP.SOP.LS.93.9.doc).

### Literatura académica

- Amory et al, "Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains" *Forensic Science International: Genetics*, 2012, disponible [https://www.fsigenetics.com/article/S1872-4973\(11\)00155-4/fulltext](https://www.fsigenetics.com/article/S1872-4973(11)00155-4/fulltext)
- Dabney et al., "Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, disponible <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
- Loreille et al., "High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization", *Forensic Science International: Genetics*, 2007, disponible <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19083754/>
- Rholand et al. "Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing", *Nature Protocols*, 2018, disponible <https://reich.hms.harvard.edu/sites/reich.hms.harvard.edu/files/inline-files/s41596-018-0050-5.pdf>
- Xavier C., Eduardoff M., Bertoglio B., Amory C., Xavier C., Casas-Vargas A., Pallua J., Parson W., "Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age" *MPDI Genes*, 2021.



**PERSONAS  
INSTRUCTORAS**



## Dirección Técnica

### **Dra. Mayra Eduardoff (Alemania-México)**

Jefa de los Laboratorios de ADN,  
Co-Coordinadora del Departamento de Ciencia y Tecnología de ICMP

La Dra. Eduardoff funge como jefa de los Laboratorios de ICMP y es Co-coordinadora del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Comisión Internacional de Personas Desaparecidas (ICMP). En este cargo supervisa el trabajo de análisis de ADN en restos óseos y de muestras de referencia a petición de los Estados socios de ICMP. La Dra. Eduardoff también lidera la implementación de programas de transferencia de capacidades para laboratorios nacionales en más de 20 países y dirige los programas de investigación científica dentro de ICMP para avanzar las técnicas forenses de identificación humana de restos óseos. De igual forma, lidera el componente científico del programa de ICMP en México.

De 2019 a 2020 estuvo basada en Monterrey, coordinando las actividades científicas realizadas por ICMP con el Instituto de Criminalística y Servicios Periciales de la Fiscalía General de Justicia del Estado de Nuevo León dentro del Programa, “Justicia para los Desaparecidos en Nuevo León” que se implementa con la organización de la sociedad civil CADHAC y con el financiamiento de USAID.

La Dra. Eduardoff tiene un Doctorado con honores en Genética y Genómica de la Universidad de Innsbruck, una Maestría en Biología Molecular, y una Licenciatura en Microbiología. Asimismo, es graduada de Economía y Administración. La Dra. Eduardoff trabaja en ICMP y tiene una larga trayectoria profesional en la coordinación forense, la investigación y el desarrollo de procesos científicos aplicados a la identificación humana, incluso en el laboratorio de la Universidad de Innsbruck trabajando en los casos de estudiantes desaparecidos de Ayotzinapa, así como en el Comité Internacional de la Cruz Roja, Delegación en Georgia.

Dentro de las publicaciones científicas de la Dra. Eduardoff destacan:

- Xavier C., Eduardoff M., Bertoglio B., Amory C., Xavier C., Casas-Vargas A., Pallua J., Parson W., “Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age” MPDI Genes, 2021.
- Eduardoff M (ca), Xavier C., Strobl C., Casas-Vargas A., Parson W. (ca), “Optimized mtDNA Control Region Primer Extension Capture Analysis for Forensically Relevant Samples and Highly Compromised mtDNA of Different Age and Origin”, MPDI Genes, 2017.
- Eduardoff M, Santos C., de la Puente M., Gross, T.E., Fondevila M., Strobl C., Sobrino B., Ballard D., Schneider P.M., Carracedo Á., Lareu M.V., Parson W., Phillips C., “Inter-laboratory evaluation of SNP-based forensic identification by massively parallel sequencing using the Ion PGMTM” in Forensic Science International Genetics, 2015.

## Personas Instructoras

### **Mtro. Kieren Hill (Reino Unido)**

Jefe de Gestión de Casos  
Laboratorio de ADN de ICMP

Funge en ICMP como gerente de casos del Laboratorio de ADN y desarrollando y validando métodos en particular en relación con la extracción de ADN de restos óseos y los métodos de perfiles de ADN STR dentro del Laboratorio de Investigación de ICMP. El Sr. Hill también tiene responsabilidades relacionadas con la gestión operativa de los casos y la gestión de la calidad dentro del Laboratorio de Casos de ICMP.

Su formación académica incluye estudios de licenciatura en Ciencias Biomédicas Universidad de Nottingham y un máster en Ciencias Forenses, Teesside University. Antes de incorporarse a ICMP, trabajó en la división de genética forense de Key Forensic Services, proveedor comercial de ciencias forenses en el Reino Unido durante más de 5 años. Adquirió experiencia en operaciones de casos, desarrollo de métodos y resolución de problemas de instrumentos; también participó en la creación de capacidades externas, tanto en el Reino Unido como a nivel internacional, impartiendo formación científica a expertos técnicos como personas no científicas.

### **Mtra. Virginia Hernández de la Cruz (España)**

Oficial de Ciencia y Tecnología del Programa México,  
Laboratorio de ADN de ICMP

Tiene más de quince años de experiencia profesional dentro del campo del análisis de ADN, ha trabajado para los laboratorios de criminalística-ADN de la Comisaría General de Policía Científica del Cuerpo Nacional de Policía de España.

Su desarrollo profesional ha girado en torno al análisis y determinación de fluidos biológicos en cualquier tipo de prueba forense, extracción de ADN de cualquier tipo de vestigio biológico, y en la elaboración de informes periciales sobre el uso forense del análisis de ADN.

La Mtra. Hernández de la Cruz tiene un Máster en Ciencias Policiales de la Universidad de Salamanca, y una Licenciatura en Ciencias Biológicas, especialidad en Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

## Investigación

### **Lisa Vangeel (Bélgica)**

Asociada de Investigación, incorporada al laboratorio de investigación de ICMP desde 2019. Cuenta con estudios de licenciatura en biología.

## **Analistas de ADN participando en las demostraciones de laboratorio**

### **Amela Bojcic (Bosnia-Herzegovina)**

Analista de ADN Senior, incorporada al laboratorio de casos de ICMP desde mayo de 2005. Cuenta con estudios de licenciatura en biología.

### **Elvarisum Salcin (Bosnia-Herzegovina)**

Analista de ADN, incorporado al laboratorio de casos de ICMP desde mayo de 2001. Cuenta con estudios de licenciatura en biología.



**LA COMISIÓN  
INTERNACIONAL  
SOBRE PERSONAS  
DESPARECIDAS**



## Sobre la Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas -ICMP

La Comisión Internacional sobre Personas Desaparecidas (ICMP) trabaja con gobiernos, organizaciones de la sociedad civil, instituciones de justicia, organizaciones internacionales y otros a través del mundo para abordar el tema de las personas que han desaparecido como resultado de un conflicto armado, violaciones de los derechos humanos, desastres, crimen organizado y otras causas.

Creada en 1996 para ayudar a los países de la región de los Balcanes Occidentales en la localización de las 40,000 personas desaparecidas como consecuencia de los conflictos en la antigua Yugoslavia, ICMP ha desarrollado metodologías que incluyen la ayuda a los gobiernos para crear legislación y establecer instituciones que apoyen el proceso de dar cuenta de las personas desaparecidas, aplicando los últimos avances de la ciencia genética forense junto con sistemas informáticos y de datos personalizados, y ayudando a las familias de los desaparecidos a desempeñar un papel efectivo en el proceso de búsqueda.

El enfoque de ICMP se basa en la defensa y fortalecimiento del Estado de Derecho. Su experiencia demuestra que los programas de personas desaparecidas a gran escala pueden tener éxito si el Estado asume la responsabilidad de los procesos de localización de los desaparecidos e investiga las circunstancias de su desaparición. Cuando las autoridades nacionales abordan la cuestión de forma transparente, basándose en los derechos humanos y el Estado de derecho, refuerzan la confianza de la población en las instituciones clave, como los tribunales, los fiscales y las fuerzas de seguridad, e inician un proceso de reconstrucción de la cohesión social. Para ello, es necesario que la legislación y las instituciones adecuadas estén en marcha, que la ciencia forense y la tecnología de las bases de datos se apliquen de forma coherente y adecuada a la magnitud de las desapariciones y que las familias de los desaparecidos estén capacitadas para participar y exigir respuesta del Estado.

En 2021, ICMP celebró su 25º aniversario; la experiencia adquirida en el transcurso de este primer cuarto de siglo representa una base notable y única que permite avanzar, desarrollar nuevos programas y ayudar a los gobiernos, a las familias de los desaparecidos y a otras personas a abordar el reto global de las personas desaparecidas.

Como la única organización internacional que trabaja exclusivamente en este tema:

- ICMP está activamente comprometida en desarrollar instituciones y la capacidad de la sociedad civil, promoviendo leyes, fomentando la defensa social y política, y desarrollando y proporcionando experticia técnica para localizar e identificar los desaparecidos.
- ICMP trabaja con gobiernos para desarrollar sus capacidades institucionales para abordar el problema de las personas desaparecidas en una manera eficiente e imparcial.
- ICMP ayuda a los gobiernos a elaborar leyes para salvaguardar los derechos de las

familias de los desaparecidos y trabaja con organizaciones de la sociedad civil para que se empoderen en defender sus derechos.

- ICMP asiste al proceso de justicia asegurando que los gobiernos se adhieran a un acercamiento que se basa en la ley para investigar las desapariciones y proporciona pruebas en los juicios penales.
- ICMP presta asistencia a los gobiernos con el trabajo de campo. Ha participado en la excavación de más de 3,000 fosas comunes y clandestinas, y ha encabezado la aplicación de técnicas forenses avanzadas para localizar y recuperar personas desaparecidas.
- ICMP mantiene un Centro de Consulta en Línea (OIC) único en su tipo y un Sistema de Administración de Bases de Datos de Identificación (iDMS) que administra todos los datos pertenecientes a casos de personas desaparecidas.
- Opera la instalación más avanzada en el mundo de identificación de ADN humano. Actualmente, se han identificado más de 19,000 personas desaparecidas en el mundo con la ayuda de ICMP y especialmente con un enfoque de identificación humana a gran escala que es liderado por ADN.
- ICMP también proporciona programas de entrenamiento y educación a un amplio espectro de personas incluyendo: autoridades gubernamentales, fiscales y jueces, ONG's, familias de los desaparecidos y forenses.

## Sobre ICMP en México

El trabajo de ICMP en México tiene como objetivo a largo plazo crear un proceso sostenible que contribuya a mejorar la respuesta al problema de las personas desaparecidas, en particular reduciendo el atraso forense mediante la identificación de personas fallecidas no identificadas.

En relación con la colaboración entre USAID y FGR para la creación de este programa de capacitación y mentoría en identificación humana, el proyecto implementado por ICMP ayudará al Laboratorio Central de Genética Forense de la FGR a optimizar e implementar nuevos métodos que aumenten su éxito en la identificación de personas desaparecidas.

*Para conocer más sobre el problema de las personas desaparecidas en México, sírvase escanear con la cámara su celular el siguiente código QR.*

*Para acceder al video de forma digital, diríjase a la siguiente liga: <https://vimeo.com/652802231>*







**USAID**  
DEL PUEBLO DE LOS ESTADOS  
UNIDOS DE AMÉRICA



**FGR**  
FISCALÍA GENERAL  
DE LA REPÚBLICA



**icmp**  
International Commission on Missing Persons