

## EL ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE ADN A PARTIR DE RESTOS ÓSEOS Y DIENTES Y SUS APLICACIONES EN LA IDENTIFICACIÓN DE DESAPARECIDOS

FABRICIO GONZÁLEZ-ANDRADE\*

DORA SÁNCHEZ\*

BEGOÑA MARTÍNEZ-JARRETA\*\*

**Resumen:** La identificación de desaparecidos y restos cadavéricos por medio de técnicas de análisis de polimorfismos ADN se ha convertido en una actividad frecuente dentro de la rutina pericial de muchos laboratorios de Genética Forense. En muchos de estos casos la extracción de ADN debe realizarse a partir de dientes y de piezas óseas, y esta tarea no resulta siempre sencilla y directa, en particular cuando se ha de trabajar sobre hueso. La extracción en muchos casos implica cierto grado de dificultad que no debe infravalorarse *a priori*, si bien la misma no es constante y variará dependiendo del método utilizado y sobre todo de la calidad/conservación de las muestras. Como consecuencia de lo anterior se impone la necesidad de establecer protocolos propios en cada laboratorio, y que los mismos se elaboren teniendo en cuenta estas circunstancias y las características, peculiaridades y necesidades locales. El análisis de ADN es una poderosa herramienta en la identificación individual y así debe considerarse también dentro de un proceso general de identificación de restos óseos y de cadáveres de desaparecidos, sin embargo no ha de conceptuarse como un método excluyente o sustitutivo, sino como complementario de otros que resultan igualmente fundamentales en estos supuestos (i.e.: métodos y técnicas propias de la antropología y odontología forense). En este trabajo se realiza una revisión general de estudio del polimorfismos de ADN a partir de restos óseos y dientes y sus aplicaciones en la identificación de desaparecidos.

---

\* Laboratorio de Genética Molecular. Hospital Metropolitano. Quito, Ecuador.

\*\* Profesora Titular de Medicina Legal y Forense. Departamento de Medicina Legal. Universidad de Zaragoza, España.

**Palabras clave:** Extracción de ADN. Huesos. ADN. STRs. Justicia. Ecuador.

**Abstract:** The identification of disappeared persons and corpse remains by means of DNA polymorphism analysis techniques has become a frequent activity within the expert routine of many Forensic Genetics laboratories. In many of these cases, the DNA must be extracted from teeth and bone parts, and this task is not always simple and direct, especially when having to work on bone. In many cases, the extraction involves a certain degree of difficulty, which must not be undervalued a priori, although the extraction is not constant and will vary depending on the method used and above all on the quality / preservation of the samples. As a result of the above, the establishment of own protocols in each laboratory is imperative, as well as for these to be prepared bearing in mind these circumstances and characteristics, peculiarities and local needs. DNA analysis is a powerful tool in individual identification and it must be considered as such, too, within a general identification process of bone remains and of corpses of disappeared persons. However, it must not be regarded as ruling out or replacing others, but as an additional method to others that are equally essential in these cases (i.e. own methods and technology of forensic odontology and anthropology). This work carried out a general review of the study of DNA polymorphisms based on bone remains and teeth and its applications in the identification of disappeared persons.

**Key words:** DNA extraction. Bones. DNA. STRs. Justice. Ecuador.

Este trabajo explica de forma sucinta la importancia del ADN en sus aplicaciones a la identificación de desaparecidos, mediante el análisis de los restos óseos y dientes. Cabe señalar que en el mundo contemporáneo, cada vez más agitado y violento, son numerosas las personas que desaparecen por distintos motivos, para tal vez posteriormente aparecer como cadáveres, cuya identidad habrá de investigarse. En muchos países, particularmente de América Latina, a pesar de la aparente paz, la criminalidad y la violencia callejera, dejan cada vez más víctimas y desaparecidos. En otros casos, como en los conflictos armados, la desaparición de personas se puede llegar a convertir en un *modus operandi*, para reprimir a la población a la que se somete. Todo ello ha generado una fuente casi inagotable de trabajo para muchos Laboratorios de Genética Forense, que se ven en la dura tarea de dar una respuesta a los familiares y a la sociedad civil en general.

En muchas situaciones donde, por las circunstancias del hecho, la posibilidad de la identificación es muy complicada, como ante muestras biológicas antiguas, restos o fragmentos humanos, etc. la prueba del ADN va a ser la única vía de investigación. El tipo de muestras a analizar depende del estado del cadáver o los restos hallados, pudiéndose encontrar situaciones diversas. En muchos casos, el uso del ADN ofrece una respuesta defini-

tiva en la identificación humana, sin embargo, aunque es una técnica altamente discriminativa, no siempre es suficiente y son muchos los casos en que no es capaz de reemplazar a la evaluación antropológica (Budjimila Z, y cols. 2003). El análisis de ADN puede ser utilizado para identificar un individuo o para excluir falsos positivos de identificación humana (Hochmeister M y cols., 1991). La identificación de cuerpos se hace utilizando muestras sanguíneas de familiares y la información derivada del árbol genealógico (*pedegree*), de tal manera que se pueda predecir el genotipo del familiar desaparecido como si se tratase de un caso estándar de paternidad o maternidad. El número de familiares analizados es importante para la obtención del coeficiente de verosimilitud a partir del estudio genético realizado. Para el cálculo de ese coeficiente resulta imprescindible utilizar las bases de datos poblacionales correspondientes al grupo étnico o poblacional en cuestión (González F, Martínez-Jarreta B, 2005).

Con el fin de identificar los restos antiguos, restos o fragmentos humanos, se pueden utilizar los efectos personales de los individuos desaparecidos, como son cepillos de dientes, peines, maquinillas de afeitarse y en general cualquier soporte sobre el que exista la certeza de encontrar tejidos o células de la persona que buscamos. No siempre podremos establecer un perfil genético único, en ocasiones sólo podremos obtener varios perfiles, lo que descarta el uso del efecto analizado. Otro recurso interesante es el uso de muestras biológicas obtenidas del desaparecido previamente, como muestras de sangre o biopsias, que se guardan archivadas en centros hospitalarios o asistenciales. Sin duda algo que puede parecer trivial pero que es de notoria importancia es conocer con plena certeza la procedencia de las muestras de cotejo (González F, Sánchez D, 2004).

*Tipos de estudios para identificación.* Clásicamente, existen dos situaciones establecidas (Huffine E, 2001). Los estudios CERRADOS, en los cuales los restos de un miembro de la familia son reconocidos por un efecto personal, por una característica física personal individual (*ante mortem* y *post mortem*), o por un documento o credencial personal (Documento Nacional de Identidad-DNI, o Cédula de Identidad) encontrado cerca del cuerpo. En estos casos el estudio de ADN tiene el carácter de confirmatorio de la identidad ya que existe un familiar reclamante, en otras palabras, conocemos cuál habría de ser la identidad *a priori*. Los estudios ABIERTOS, involucran restos en los cuales tenemos poca o ninguna información previa, o se desea contrastar un número incierto de desaparecidos con un número determinado de restos cadavéricos, con la participación de algunos posibles familiares reclamantes. Desde luego, en este segundo caso las probabilidades de identificación positiva disminuyen (Clayton TM y cols., 1995).

*Identidad de una persona.* Las cuestiones relacionadas con la identificación de las personas tienen una enorme importancia en Medicina Legal, tanto en el caso de sujetos vivos como el de cadáveres. Una de las acepciones de la palabra *identificar* es reconocer si una persona es la que se busca.

Es decir, se trata de establecer su individualidad determinando aquellos rasgos o conjunto de cualidades que la distinguen de todos los demás y hacen que sea ella misma.

Para la identificación de desaparecidos, los polimorfismos de ADN en muestras de cadáveres o restos cadavéricos amplían la posibilidad de conocer la identidad de la persona a la que pertenecen, ya que en muchas ocasiones otros métodos tradicionales no lo permiten. El ADN es una molécula muy estable en el medio ambiente, lo que facilita su estudio en restos de gran antigüedad, si bien las posibilidades de éxito dependen más de las condiciones de conservación que de la edad/antigüedad de las muestras (Lorente J y cols., 2001).

En las grandes catástrofes producidas por fenómenos naturales como inundaciones, terremotos, etc., por accidentes de tráfico (aéreo, terrestres, etc.), o intencionadas como atentados terroristas y conflictos armados, el análisis se realiza a partir de restos humanos y dado el estado de los mismos (en muchas ocasiones se reduce a pequeños fragmentos de huesos o tejidos), las posibilidades de identificación de las víctimas quedan limitadas al análisis de los polimorfismos de ADN (Corach D, 1995). Este análisis nos permite buscar la coincidencia de esos fragmentos y ponerlos en relación con personas vivas, con algún grado de parentesco. El cuadro 1 muestra los métodos más utilizados en la identificación humana.

Cuadro 1. Métodos utilizados en identificación humana

INDIVIDUOS VIVOS	CADÁVERES O RESTOS CADAVERICOS (FRAGMENTOS)
Identificación general: sionomía, sexo, peso, talla y edad, color de cabello y de piel, marcas particulares individuales	Diagnóstico de especie
Huellas dactilares	Datación de los restos por métodos morfológicos, químicos y biológicos (entomología forense)
Registro de la voz	Identificación somática: etnia, sexo, edad y talla
Trazado caligráfico	Información individualizada del cadáver: objetos encontrados, características patológicas individuales, identidad radiológica. Comparación de datos <i>ante mortem</i> y <i>post mortem</i> .
	Identificación odontoestomatológica (odontología forense)
	Métodos bioquímicos: grupos sanguíneos, proteínas plasmáticas, enzimas eritrocitarias, sistema HLA
<b>Perfiles de ADN (huella digital genética o DNA fingerprinting)</b>	

Elaboración: autores.

En la rutina médico-forense, la identificación positiva del cadáver, debe realizarse utilizando todos y cada uno de los recursos disponibles. Algunos patólogos forenses (Di Maio V, Dana S, 2002), clasifican a los métodos de identificación en dos grupos principales:

*Grupo I:* Identificación del cadáver por parientes y/o amigos; identificación basada en documentos del cadáver, ropas, cicatrices o tatuajes; identificación por exclusión, etc.

*Grupo II:* Huellas dactilares, identificación dental y métodos antropométricos, análisis de ADN, comparación de placas radiográficas *ante y post mortem*.

Si el patólogo o el forense se encuentran con un cadáver sin identificar, y los intentos básicos de identificación han sido inútiles, se recomiendan las siguientes acciones, de forma previa a su envío o enterramiento: tomar fotografías del rostro y del cuerpo, hacer un gráfico y una placa radiográfica de los dientes, tomar las huellas del cadáver, realizar radiografías corporales y tomar muestras de tejidos para posterior análisis de ADN (Di Maio V, Dana S, 2002).

*Las muestras en la identificación de cadáveres.* Se considera MUESTRA a todo vestigio biológico de un ser humano u otro ser vivo que pueda ser analizado por una técnica de laboratorio. En Genética Forense las muestras provienen con frecuencia de los individuos implicados en un delito, o de las personas que solicitan una prueba de paternidad. En criminalística, las muestras pueden obtenerse de la víctima de hechos delictivos, de los instrumentos usados, del autor del delito y del escenario del crimen, etc. Una muestra obtenida adecuadamente puede llegar a ser una EVIDENCIA durante un proceso judicial, y una evidencia a su vez puede ser utilizada para demostrar la relación o contacto habido entre varias personas, demostrar la relación de una muestra de una determinada persona con un delito y demostrar que los restos hallados corresponden a un determinado individuo (González F, Martínez B, 2001).

En la práctica, las muestras que se obtienen de una escena criminal contienen cantidades considerablemente menores de ADN. Esto se debe a varios factores que afectan la disponibilidad del material genético:

1. *Cantidad:* Lo habitual cuando hay muy poca muestra hay muy poco ADN (a pesar de la sensibilidad de la técnica utilizada).
2. *Degradación del ADN:* El ADN se puede degradar con facilidad por la exposición prolongada a condiciones ambientales adversas o por contaminación bacteriana o micótica.
3. *Pureza de la muestra:* La presencia de suciedad, grasa, impurezas y otros contaminantes puede llegar a inhibir la amplificación del ADN de la muestra durante la PCR.

No se puede extraer igual cantidad de ADN de todos los tipos de muestras, existe un rango de variación de rendimiento en la extracción entre unas y otras, como observamos en la siguiente tabla.

Cuadro 2. Contenido de ADN en diferentes muestras biológicas

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD DE ADN DISPONIBLE	CONSERVACIÓN
Sangre líquida Sangre en soportes	20 a 40 µg/mL 250 a 500 ng/mL	Refrigerar a 4º C Secar al ambiente y guardar en sólidos (manchas) bolsas de papel
Hisopado vaginal o rectal	250 a 500 ng/mL	Secar y guardar en un tubo estéril al ambiente
Semen líquido	150 a 300 µg/mL	Refrigerar a 4º C
Semen en frotis postcoital	10 a 3.000 ng/mL	Refrigerar a 4º C
Pelo con bulbo arrancado	1 a 750 ng/bulbo	Al ambiente
Saliva	1 a 10 µg/mL	Secar y guardar en bolsas de papel al ambiente
Frotis bucal	1 a 1,5 µg/mL	Secar al ambiente y guardar en bolsas de papel
Orina	1 a 20 ng/mL	Congelar a - 4º C
Huesos (según condiciones)	3 a 10 ng/mg de hueso	Limpiar y guardar en bolsas de papel
Fluido amniótico	65 ng/mL	Congelar a - 4º C
Vellosidad corial	8 µg/mg	Congelar a - 4º C
Hígado	15 µg/mg	Congelar a - 4º C
Músculo	3 µg/mg	Congelar a - 4º C

Fuente: González F, 2001. Elaboración: autores.

Una de las responsabilidades del forense es determinar la identidad de un cadáver. Sin embargo, esto no siempre es posible. Por ello, debe establecerse una identificación presunta o provisional, para luego establecer la identidad definitiva con otros métodos, en particular, el análisis de ADN. A pesar de ello, hay ocasiones en que no se logra una identificación definitiva nunca. Se recomienda siempre, antes de proceder al enterramiento o a la inhumación, recolectar muestras y objetos, que podrían ser utilizados en un futuro, como lo señala el cuadro 3.

Cuadro 3. Recursos necesarios para identificación posterior de cadáveres

MUESTRA /RECURSO	CUERPO NO DESCOMPUESTO	CUERPO DESCOMPUESTO	CUERPO CARBONIZADO	ESQUELETO
Foto en color de la cara, frontal y de perfil, con un número de identificación previo	Sí	Sí	Sí	-
Foto en color de marcas (tatuajes, cicatrices, piercing, etc.)	Sí	Sí	-	-
Fichas completas de huellas dactilares, y cuando se pueda palmares y plantares (usar sistemas consensuados)	Sí	Si se dispone	-	-
Ficha dental y radiografía (panorámica dental)	Sí	Sí	Sí	Sí
Huesos maxilar inferior y superior		Sí	Sí	Sí
Radiografías del cráneo (donde se observen los senos frontales y maxilares)	Sí	Sí	Sí	Sí
10 a 20 cc de sangre con EDTA (análisis de ADN)	Sí	Si se dispone	Sí	-
Pelos con bulbo, mínimo 10 pelos (ADN)	Sí	-	-	Si se dispone
Hueso largo con médula, fémur o húmero (ADN)	-	Sí	Si es posible	Sí
Ropa y efectos personales (dentaduras, audífonos, marcapasos, prótesis, etc)	Sí	Sí	Sí	Sí

Elaboración: autores.

*El ADN en el tejido óseo.* Aunque esperamos que el ADN sea virtualmente idéntico en todas las células del cuerpo, su estabilidad *post mortem* difiere significativamente de un tejido a otro. El ADN se degrada rápidamente en tejidos blandos de cuerpos en descomposición como consecuencia inmediata del crecimiento bacteriano y la influencia de factores medioambientales. Estudios realizados en diferentes tejidos indican que en el hígado el ADN tiende a degradarse más rápidamente, mientras que en el músculo cardíaco, bazo y hueso tiende a estar menos degradado. La protección del medio externo que la matriz ósea brinda al ADN hace del hueso el último recurso para obtener información genética cuando el resto de tejidos es inútil para este fin. Y decimos bien último recurso, pues el proceso de extracción de ADN del hueso es siempre complicado y a veces infructuoso, por lo que trabajar con restos óseos implica que se ha elimi-

nado cualquier otra posibilidad de obtener ADN (restos con alto grado de descomposición, procedentes de exhumaciones, restos antiguos, etc.), aunque si las condiciones son adversas, ni siquiera el ADN atrincherado en el hueso es inmune a la degradación (Prieto V, 2004).

*Degradación del ADN en tejidos.* Cuando un organismo muere, su ADN se degrada rápidamente por la acción de nucleasas endógenas. Sólo bajo circunstancias afortunadas como una desecación rápida, bajas temperaturas o alta concentración de sales, las nucleasas pueden destruirse o inactivarse frenando los procesos de degradación. Es un hecho universalmente aceptado la ausencia de correlación entre la edad de un espécimen y su estado de conservación, que depende mucho más directamente de su entorno inmediato. Yacimientos en áreas activas de suelo o medios húmedos reducen drásticamente la probabilidad de éxito en la extracción de ADN en cortos periodos de tiempo. En un estudio sobre varios especímenes momificados (humanos y animales), se comprobó que un espécimen de 4 años muestra la misma degradación, en cuanto a fragmentación del ADN, que uno de 100 años, comparable también a lo que se observa en momias de 5.000 y 13.000 años de antigüedad (Pääbo S, 1989). Ya que sabemos de partida que el ADN de este tipo de muestras será escaso y degradado, la elección del método de extracción será crucial y, a menudo, supone un compromiso entre cantidad y calidad. El problema se centra en maximizar la producción de ADN y la eliminación de inhibidores, minimizando las pérdidas de ADN en sucesivos pasos de purificación. La escasa cantidad de ADN recuperado en algunos casos (subnanogramos) es especialmente sensible o muy vulnerable a sufrir contaminaciones (tabla 2) ya que ni siquiera el autoclavado degrada el ADN lo suficiente como para hacer imposible amplificaciones de 100 pb (Pääbo S, 1990). En este sentido, todas las precauciones conocidas para minimizar el riesgo de contaminaciones deben observarse escrupulosamente.

Cuadro 4. Fuentes de contaminación de restos óseos y dentales

TIPO ADN	FUENTE	PREVENCIÓN
Humano (previo al laboratorio)	Contacto con otros restos en enterramientos colectivos Por personal que recoge las muestras	Lavado exhaustivo de muestras en laboratorio Uso de guantes, mascarillas, etc.
Humano (en el laboratorio)	Por el manipulador Contaminación cruzada con muestras procesadas simultáneamente Transferencia de productos de PCR previas (reactivos/ material contaminado)	Uso de guantes, mascarillas, etc. Uso de controles Uso de controles
No humano	Bacterias, hongos, insectos, etc	Uso de cebadores humanos

Fuente: Prieto V, 2004.



En este apartado trataremos las piezas dentales y restos óseos por separado como fuentes potenciales de ADN y su procesado previo hasta la pulverización. A partir de este punto, las estrategias de extracción son comunes a ambos tipos de muestra. Trataremos distintos tipos de extracción, contemplando la controversia entre métodos con y sin descalcificación, distintas estrategias para superar los problemas derivados de la presencia de inhibidores y, por último, veremos algunas modificaciones presentes en el ADN productos del envejecimiento y del medio ambiente.

### ANÁLISIS DEL ADN DENTARIO

*Características del tejido dental.* El tejido blando de las cámaras de pulpa coronal y radicular está formado por odontoblastos, fibroblastos, células endoteliales, células nerviosas periféricas, células de mesénquima no diferenciadas y células sanguíneas. La celularidad del tejido de la pulpa decrece con la edad, a medida que se incrementan los elementos intercelulares fibrosos. El volumen medio de pulpa presente en un diente es de 0.02 mL, con máximos de 0.023 mL en el tercer molar del maxilar y 0.031 mL en el tercer molar mandibular. La cámara de pulpa decrece con la edad y con la irritación por las deposiciones secundarias de dentina.

*Recuperación teórica de ADN.* En condiciones óptimas, un diente puede rendir entre 15 y 20 µg de ADN de alto peso molecular, sin embargo, son muchos los factores que afectan esta teórica cantidad y calidad de ADN extraído, siendo el más importante el tipo de suelo (Prieto V, 2004).

*Factores que afectan a la cantidad y calidad del ADN extraído de dientes.* Del entorno: tipo de diente, patologías o traumas, edad del donante, antigüedad del diente, variabilidad interindividual, de la cantidad de pulpa. De la muestra: parámetros controlados en laboratorio como pH, temperatura, humedad, tipo de suelo, agua de mar, enterramiento, antigüedad. En muestras reales: historia desconocida concurrencia de factores.

*Acceso al ADN encerrado en la pulpa dental.* Se contemplan básicamente dos métodos: la pulverización total de la pieza dental y la sección, normalmente horizontal, del diente, cada una de ellas con sus pros y sus contras.

- Pulverización total del diente: aumenta el riesgo de contaminación por material externo al diente y de degradación por exposición a nucleasas bacterianas, pero conlleva una mayor proporción de ADN recuperado.
- Sección transversal u horizontal del diente: permite una extracción selectiva de la pulpa dental y una extracción de ADN de mayor calidad que el caso de la pulverización pero supone mayor tiempo empleado en seccionar el diente, mayor dificultad para recoger la muestra, mayor riesgo de pérdidas y menor cantidad de ADN recuperado.

*Precauciones.* Con el fin de evitar el contacto de la pulpa con el medio externo y prevenir contaminaciones, se han llegado a diseñar sofisticados sistemas como la inclusión de la pieza dental en silicona para acceder a la pulpa por sección radicular. Para minimizar el riesgo de contaminación externa es siempre recomendable someter el diente a tratamientos de limpieza previos a la pulverización y extracción de ADN. Se utilizan indistintamente soluciones jabonosas, alcohólicas (etanol al 70%), hipoclorito al 5 o 10%, etc. El hervido de las piezas dentales no es recomendable ya que se sabe que las altas temperaturas afectan a la recuperación de ADN. Los dientes encerrados en hueso y tejido blando son más resistentes al efecto de la temperatura que los dientes aislados.

## EL TEJIDO ÓSEO

*Características del tejido óseo.* La mayor parte del ADN del hueso compacto está localizado en los osteocitos, restos de los osteoblastos que secretaron hueso alrededor de ellos y se aislaron de la matriz extracelular. Existen aproximadamente de 20.000 a 26.000 osteocitos por mm<sup>3</sup> de matriz de hueso calcificado.

*Recuperación teórica de ADN.* En muestras de laboratorio, huesos control entre 3.3 y 16 µg ADN por gramo de polvo de hueso extraído; huesos expuestos a factores ambientales externos, cerrados en bolsas de plástico, inmersos en agua o enterrados en suelo: entre 25 ng y 1.7 µg de ADN de peor calidad que en los anteriores por gramo de polvo de hueso. En muestras forenses, con «historia desconocida», la producción media decae hasta tres órdenes de magnitud, moviéndonos en el rango de nanogramos en el mejor de los casos o picogramos. Aunque la cantidad de ADN recuperado de huesos suele ser alta cuando se analiza ADN total en gel de agarosa con bromuro de etidio, el análisis de ADN humano con sondas específicas muestra que en especímenes deteriorados el ADN humano puede suponer hasta menos de un 1% del total, correspondiendo el resto a ADN bacteriano y fúngico. En cuanto a su degradación, es normal en muestras deterioradas que se obtenga un ADN con un tamaño medio de fragmento inferior a 500 pares de bases. Se observa que la variabilidad de producción de ADN depende del tipo de hueso, incluso dentro de un mismo individuo.

*Procesado previo de huesos.* El procesado previo de los restos óseos debe comenzar siempre por la limpieza del espécimen, al igual que en las piezas dentales, para liberarlo de cualquier resto de tejido blando y descontaminarlo. En muchos protocolos publicados se contempla la eliminación de una capa superficial de 1 ó 2 mm por lijado para evitar la contaminación con ADN exógeno depositado en el exterior del hueso. También se utiliza el lavado con agua destilada estéril, soluciones jabonosas, etanol 70% o 95%, etil éter o hipoclorito al 5 o 10 %, la irradiación con UV, etc. Tras la limpieza, el hueso se fragmenta y se sumerge en nitrógeno líquido para su pulverizado.

Para minimizar la frecuencia de contaminación dentro del laboratorio, el Grupo Europeo de Perfiles de ADN (European DNA Profile Group) ha desarrollado una serie de recomendaciones que deben tenerse en cuenta en el momento de procesar una muestra con fines de identificación humana:

- Usar un control negativo tanto en el proceso de extracción como en el de amplificación y, en este último paso, usar también un control positivo.
- Áreas separadas para la pre-PCR y la post-PCR.
- Uso de pipetas con presión positiva o puntas resistentes a aerosoles durante todo el proceso de amplificación.
- Todo el material de plástico debe ser previamente esterilizado, preferiblemente mediante UV. Además, todas las soluciones usadas en las operaciones de pre-PCR deben esterilizarse mediante autoclavado o con UV.
- No amplificar conjuntamente muestras que a priori tengan mucha o poca cantidad de ADN o muestras de referencia con muestras dubitadas.
- En aquellos casos en que se disponga de muestra suficiente debería duplicarse el proceso de extracción y el de amplificación por personas diferentes.
- Es necesario disponer del tipado genético de todo el personal que trabaja dentro del laboratorio.

Estos criterios no eliminan completamente la contaminación, pero minimizan su frecuencia, hacen que sea fácilmente trazable y la política de duplicación de análisis asegura que no se emitan resultados erróneos.

## EXTRACCIÓN

1. *Pulverización*: El paso previo obligado para acceder al ADN presente en los huesos y dientes es la pulverización. Esta puede llevarse a cabo de forma manual tras la inmersión de los fragmentos óseos en nitrógeno líquido, aunque hoy en día está muy extendido el uso de criopulverizadores magnéticos.
2. *Descalcificación*: Una vez obtenido el polvo, éste puede o no someterse a procesos de descalcificación con una solución quelante, tema que conlleva cierta controversia entre los distintos autores consultados (cuadro 5).
3. *El protocolo de extracción más extendido*, admitiendo pequeñas variaciones, es el propuesto por Hochmeister (Hochmeister, 1991). Además de este método clásico, se han ensayado otros métodos alternativos para conocer su eficacia en la extracción.

Cuadro 5. Controversia sobre descalcificación de los huesos

DESCALCIFICACIÓN	ARGUMENTOS
A favor	Iones minerales del hueso pueden impedir recuperación de ADN (lavan además 3 veces con agua el producto descalcificado) Mayor rendimiento en huesos antiguos (3 meses-11 años)
En contra	Consume tiempo, es innecesaria, se duplica rendimiento

Fuente: Prieto V, 2004.

*Inhibidores.* Los extractos de restos óseos pueden contener, al igual que otras muestras forenses, componentes de bajo peso molecular, supuestamente derivados del medio de enterramiento, que copurifican con el ADN e inhiben la reacción de la PCR. Los inhibidores pueden proceder del suelo, madera, tintes textiles, etc. Muchos grupos han experimentado sistemas de limpieza post-extracción para eliminar inhibidores. Existen distintas estrategias para resolver la presencia de inhibidores en el extracto de ADN.

Cuadro 6. Posibles soluciones frente a la presencia de inhibidores

<p><i>a) Eliminación:</i> Purificación con lavados intensivos del ADN con TE en membranas tipo Centri-con o en columnas de sílice. Reextracción del ADN. Purificación por cromatografía. Minicolumnas de sílice que, en presencia de agentes caotrópicos (como el isotiocianato de guanidina) forman puentes salinos con polímeros cargados negativamente como el ADN, permitiendo el lavado de los contaminantes y posterior recuperación del ADN con un tampón de elución apropiado.</p> <p><i>b) Inactivación o bloqueo de la actividad del inhibidor mediante:</i> Choque térmico. PCR con hot start. Adición de BSA a la mezcla de reacción. Adición de cantidades extra de Taq polimerasa (aumentar los niveles de Taq facilita la amplificación incrementando la probabilidad de que moléculas diana con el cebador unido sean reconocidas y extendidas en los ciclos iniciales de la PCR).</p>
--

Cuadro 6. Posibles soluciones frente a la presencia de inhibidores (cont.)

*c) Tratamiento desnaturalizante con NaOH:*

Combina la estrategia de lavado del inhibidor en unidades Microcon 100 con un efecto inactivador por su alto pH. Bajo condiciones alcalinas, el ADN se encuentra en cadena simple, y ya que muchos de los inhibidores se intercalan en la doble cadena de ADN, la desnaturalización puede disminuir significativamente su afinidad por el ADN, permitiendo su dilución y retirada del extracto. Sin embargo, esta técnica tiene una aplicabilidad limitada para muestras límite, muy degradadas y con número de copias bajo debido a que la recuperación de ADN es aproximadamente el 50% del inicial y a la degradación que sufre el ADN de cadena simple por roturas de la cadena y renaturalización defectuosa.

*d) Titular la cantidad mínima del inhibidor capaz de bloquear la reacción de PCR*

Si no es posible retirar, inactivar o bloquear al inhibidor presente en nuestro extracto, otra estrategia sería titular la cantidad mínima del inhibidor capaz de bloquear la reacción de PCR realizando diluciones seriadas del extracto con un ADN conocido e intentar readaptar las condiciones de la amplificación a la cantidad de extracto en la que el inhibidor no sea un obstáculo.

Fuente: Prieto V, 2004.

*Nuestra experiencia en análisis de restos óseos.* En el Ecuador el análisis del ADN lleva casi una década (Sánchez D, 1998), y son los estudios de filiación y paternidad los que más solicitud han tenido hasta el momento (González F y cols., 2002).

CASO 1: DESASTRES

El miércoles 20 de noviembre de 2002 ocurrió una explosión en el interior de una de las bodegas de municiones de la Brigada de Caballería Blindada Galápagos, en la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo, dejando 7 individuos fallecidos, más de 100 heridos y 4 individuos desaparecidos. La explosión se produjo en el interior de una bodega con armamento y munición militar, y se cree que fue por una detonación accidental. El análisis se realizó por nuestro equipo de laboratorio utilizando los protocolos internos para este fin. Se analizaron 20 muestras de restos óseos y una muestra de tejidos blandos (mancha de sangre en pedazo de tela) procedentes de la zona cero de la explosión, los mismos que fueron entregados por el Médico Forense de la Fiscalía. Se tomaron muestras de los familiares de los posibles desaparecidos. Los resultados encontrados fueron:

Tabla 1. Muestras analizadas

Nº MUESTRA	TIPO DE TEJIDO	DESCRIPCIÓN INICIAL, REALIZADA POR MÉDICO FORENSE	DESCRIPCIÓN REAL REALIZADA EN LABORATORIO DE ADN
1	Hueso	Fragmento de hueso largo no identificado	Epífisis distal de peroné derecho
2	Hueso	Cabeza de articulación sin determinar	Cabeza de húmero derecho
3	Hueso	Fragmento de costilla	Fragmento de costilla
4	Hueso	Articulación de rodilla	Epífisis distal de fémur derecho
5	Hueso	Rótula	Rótula
6	Hueso	Fragmento de cráneo	Cráneo, parietales (sutura sagital)
7	Hueso	Fragmento de cráneo	Cráneo, fragmento temporal
8	Hueso	Cabeza de peroné	Calcinado, No se identifica
9	Hueso	Fragmento de fémur (exhumación)	Fragmento de fémur (exhumación)
10	Músculo	Fragmento de músculo (exhumación)	Fragmento de músculo (exhumación)
11	Hueso	Articulación de rodilla	Epífisis distal de fémur izquierdo
12	Hueso	Fragmento de astrágalo	Calcáneo izquierdo
13	Tejidos	Pedazo de uniforme con manchas de sangre	Pedazo de uniforme con manchas de sangre
14	Hueso	No identificado	No identificado
15	Hueso	Fragmento de muñeca	Fragmento de carpo izquierdo
16	Hueso	Hueso plano no identificado	Hueso plano, fragmentos de iliaco derecho
17	Hueso	Fragmento de húmero	Fragmentos de astrágalo y calcáneo izquierdo
18	Hueso	Fragmento de radio izquierdo	Fragmentos de epífisis distal del cúbito izquierdo
19	Hueso	No identificado	No identificado
20	Hueso	No identificado	No identificado
21	Hueso	Maxilar superior	Maxilar superior izquierdo con seis dientes

Tabla 2. Perfiles genéticos encontrados

SISTEMA GENÉTICO ANALIZADO	PERFIL 1	PERFIL 2	PERFIL 3	PERFIL 4	PERFIL 5
	Muestras 2-14-16-18	Muestra 17	Muestras 3- 5-6-7-8-9-10-12-15-21	Muestras 1-4	Muestras 11-20
D3S1358	14-15	15-15	15-16	15-16	16-17
HUMTH01	6-7	7-9.3	7-9.3	7-8	6-9
D21S11	29-33.2	29-30	31.2-32.2	28-31.2	29-33.2
D18S51	15-17	14-15	14-15	13-14	12-14
Penta E	15-20	-	12-19	10-15	12-21
D5S818	10-11	11-12	11-12	11-12	11-14
D13S317	9-11	9-9	9-12	8-11	11-13
D7S820	10-11	11-11	10-11	11-12	8-12
D16S539	9-14	10-12	9-12	9-12	10-11
HUMCSF1PO	11-11	11-12	10-10	11-12	10-12
Penta D	10-10	9-13	10-10	10-11	11-12
HUMvWA	14-18	16-17	15-16	17-18	16-17
D8S1179	12-13	8-13	15-15	10-16	10-17
HUMTPOX	8-11	8-11	8-12	8-8	11-11
HUMFGA	23-26	19-25	25-25	21-24	22-25
Amelogenina	XY	XY	XY	XY	XY

Tabla 3. Correlación con presuntos familiares

FAMILIA	DESAPARECIDO	STR -AMEL	FAMILIARES ANALIZADOS	MUESTRAS QUE SE CORRESPONDEN	ÍNDICE FORENSE (LR)
Familia 1	Individuo 1	XY	Presunta madre	2-14-16-18	39,794.122
Familia 2	Individuo 2	XY	Presunto padre	17	38.494
Familia 3	Individuo 3	XY	Presunta madre	3- 5-6-7-8-9-10-12-15-21	396.497
Familia 4	Individuo 4	XY	Presunta madre	1-4	1,537.512
Familia 5	Individuo 5	XY	Presunto hijo	11-20	1,236.270

Esta experiencia a nivel local nos permitió encontrar varios problemas a solucionar en un futuro, entre ellos, que no existe un real sistema médico forense en el Ecuador, ya que no contamos con especialistas en todas las áreas, no se pudo establecer un centro de información al público y, tampoco se pudo establecer un centro de coordinación adecuado. En el aspecto técnico, en la primera ronda de análisis encontramos algunos perfiles incompletos que dieron lugar a confusión, esto fue superado realizando re-extracciones de ADN y, aumento el rendimiento de la PCR.

CASO 2: IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL DE DESAPARECIDOS

Tabla 4. Casos analizados de desaparecidos

CÓDIGO INTERNO	RESTO ANALIZADO	FAMILIAR CONTRASTADO	DELITO	PROCEDENCIA	RESULTADO
For 01-99	<b>Hueso largo:</b> tibia, costillas <b>Hueso plano:</b> cráneo	Presuntos padres	Secuestro más homicidio	Enterramiento	Positivo (inclusión)
For 02-99	<b>Hueso largo:</b> fémur derecho Restos fetales	Presunto padre	Homicidio más identificación de paternidad	Enterramiento	Positivo
For 10-02	<b>Hueso largo:</b> húmero izquierdo	Presuntos padres	Desaparecido (secuestro?)	Restos putrefactos	Negativo (exclusión)
For 06-03	<b>Hueso corto:</b> fragmento de maxilar inferior calcinado <b>Dientes:</b> dos molares inferiores	Presuntos padres	Identificación de cadáver calcinado luego de homicidio	Carbonizado	Positiva
For 19-03	<b>Hueso largo:</b> fémur derecho	Presunta hija	Secuestro más homicidio posterior	Enterramiento	Positiva
For 19-03	<b>Hueso largo:</b> fémur izquierdo	Presunta hija	Secuestro más homicidio posterior	Enterramiento	Positiva
For 2-04 a	<b>Hueso corto:</b> fragmentos óseos distintos	Sin familiares	Identificación de cadáver desaparecido	Restos putrefactos	Negativa
For 2-04 b	<b>Hueso corto:</b> maxilar inferior <b>Dientes:</b> 6 piezas dentales distintas	Presunta hija	Identificación de cadáver desaparecido	Restos putrefactos	Positiva



En la tabla precedente se muestran 8 casos de extracción de ADN de huesos y dientes, para identificación de desaparecidos. Tan sólo el 75% fueron identificaciones positivas con AD, en el resto no se logró una adecuada identificación por ADN, ni por ningún otro método. Según la Fiscalía y otras ONG se calcula que en el Ecuador desaparecen 100 personas en promedio al mes, de ellos un 10% se presume que han fallecido por causas violentas. En todos los casos analizados la Fiscalía, luego del informe emitido, dictó resolución y cerró el caso.

### CASO 3: INVESTIGACIÓN DE PATERNIDAD (FILIACIÓN) CON RESTOS ÓSEOS

Se utiliza sobre todo en casos de difícil solución como identificación de restos fetales por violación o muerte del recién nacido, en estudios de paternidad *post mortem*, identificación en ausencia de padres biológicos, para establecer relaciones entre hermanos con uno de los progenitores.

## CONCLUSIONES

En relación al estudio de ADN como método de identificación:

1. La identificación de desaparecidos y restos cadavéricos por medio del análisis de ADN constituye actualmente un método de rutina en los laboratorios de Genética Forense.
2. La extracción de ADN de huesos y dientes se caracteriza por un grado variable de complejidad según el método utilizado y la calidad de la muestra objeto de estudio. Cada laboratorio debería establecer sus propios protocolos sobre la base de sus necesidades locales.
3. El éxito del estudio del ADN de huesos y dientes para la identificación humana no es total, casi nunca se alcanza el 100%, en casos abiertos con un gran número de individuos para identificar y de muestras para analizar, hay mayor número de problemas. El análisis de ADN es una poderosa herramienta pero debe considerarse exclusivamente como un importantísimo apoyo dentro de un proceso general de identificación que incluye otros métodos y técnicas también fundamentales.
4. Los miembros de los equipos forenses y de los cuerpos y fuerzas de seguridad del Estado involucrados en tareas de identificación deben establecer protocolos estandarizados que permitan responder con eficacia y prontitud a casos concretos con soluciones concretas en material de identificación de individual.

En relación al proceso general de selección de muestras:

1. El análisis inicial de los restos debe ser realizado por un patólogo forense y, el triage (selección) de las muestras por un antropólogo forense.

2. Se deben excluir los restos que no tienen relación entre sí, o no concuerdan con los tejidos blandos.
3. Se debe asignar un número o código de barras a cada espécimen o muestra por separado.
4. Se debe remover todo el tejido blando de la superficie ósea.
5. De cada grupo de muestras, para la extracción del ADN se ha de escoger aquella pieza por separado que se considere la más apropiada por las facilidades que pueda ofrecer su estudio desde el punto de vista técnico.

En relación a las bases de datos a utilizarse para contrastar la información genética:

1. Los análisis deben basarse en protocolos estándar y marcadores genéticos universalmente aceptados.
2. Los resultados deben ser reproducibles y, validados mediante programas de Control de Calidad.
3. La tecnología debe ser capaz de automatizarse, para facilitar el tipaje de grandes cantidades de muestras, y para elaborar bases de datos que puedan servir local, nacional e internacionalmente.
4. Toda la información debe ser regulada mediante una legislación adecuada, que facilite la preservación de la información confidencial de cada individuo.
5. Se deben construir Bancos de Datos realmente operativos, que puedan ofrecer alternativas en cualquier momento y circunstancia.

## REFERENCIAS Y FUENTES DE INFORMACIÓN

- BUDIMLIJA Z, PRINZ M, ZELSON-MUNDORFF A, WIESERMA J, BARTELINK E, MACKINNON G, ET AL. World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases, *Croat Med J* 2003, 44(3): 259-63.
- CLAYTON TM, WHITAKER JP, MAGUIRE CN (). Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of STR loci. *Forensic Sci Int* 1995, 76: 7-15.
- CORACH D, SALA A, PENACINO G, SOTELO A. Mass disasters: rapid molecular screening of human remains by means STR typing, *Electrophoresis* 1995, 16: 1617-23.
- DI MAIO V, DANA S. *Manual de Patología Forense*, Ed. Díaz de Santos, Edición española, 2002.
- GONZÁLEZ-ANDRADE F, MARTÍNEZ-JARRETA B. *Técnicas Instrumentales en Genética Forense*. Zaragoza: Institución «Fernando el Católico» (ed), 2001.

- GONZÁLEZ-ANDRADE F, SÁNCHEZ D, MARTÍNEZ-JARRETA B. Evaluation of 1495 cases of Disputed Paternity in Ecuador (South America) resolved with STR-PCR polymorphisms. Proceedings of International Association of Forensic Sciences, Monduzzi Ed, 2002: 225-230.
- DNA polymorphisms distribution on ethnic groups of Ecuador (South America). Focus on DNA Fingerprinting Research (en prensa), 2005.
- GONZÁLEZ-ANDRADE F, SÁNCHEZ D. El nuevo Código de la Niñez y la Adolescencia y la prueba material del ADN. F. Programa Nuestros Niños (ed.), 2004.
- HOCHMEISTER M, BUDOWLE B, BORER U, EGGMANN U, COMEY C, DIRNHOFFER R (). Typing of DNA extracted from compact bone from human remains. J Forensic Sci 1991, 36(6): 1649-61.
- HUFFINE E, CREWS J, KENNEDY B, BOMBERGER K, ZINBO A () Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslavia: structure, function, and role of the International Commission on Missing Persons. Croat Med J 2001, 2(3): 271-5.
- LORENTE J, ENTRALA C, ALVAREZ C, ARCE B, HEINRICH B, LORENTE M ET AL () Identification of missing persons: Spanish «Phoenix» Program. Croat Med J 2001, 42(3): 267-70.
- MARTÍNEZ JARRETA B. Introducción al estudio de los Polimorfismos del ADN en Medicina Forense. En: Martínez Jarreta MB (ed), La prueba del ADN en Medicina Forense. Barcelona: Masson, 1999.
- PÄABO S (1989) Ancient DNA: extraction, characterisation, molecular cloning and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci, 86: 1939-43.
- Amplifying ancient DNA. En: Innis MA et al (edit) PCR Protocols : a guide to methods and applications. San Diego (Ca.) Academic Press; 1990, 159-66.
- PRIETO V. El hueso como fuente potencial de ADN. En curso on line de Genética Forense, Universidad de Zaragoza, 2004. <http://ebro2.unizar.es/genforense/>.
- SÁNCHEZ D. Human Identification in Ecuador. In: CERÓN C (ed.) Written papers from the 22nd Symposium of Biology in Ecuador. Central University of Ecuador, 1998, 79-80.
- TRACEY M. STR identification of individuals and parents. Croat Med J 2001, 42(3): 233-8.