



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

TESIS

**COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ADN A
PARTIR DE RESTOS ÓSEOS HUMANOS POR EL MÉTODO DE
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN
FASE LÍQUIDA APLICADOS EN LA IDENTIFICACIÓN HUMANA**

Para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:
Diana Carolina López Osorio

Directora: Q.F.B. María Lourdes Vega Navarrete
Asesor: Q.F.B. Francisco Javier Parada García



México, D.F. 21 de Junio de 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos y Dedicatorias

*No digas, no puedo, debes de pensar que sí podrás hacerlo”
Esas son las palabras que papá siempre decía cuando
de pequeña decía que no podía hacer algo.
Por eso agradezco que nunca dejaste
que me rindiera... Papá.*

*Para ti lo más importante siempre han sido tus hijos
por eso doy gracias de ser tu hija, y que
siempre contare con tu amor y
apoyo incondicional.
Para ti Mamá.*

*A los gemelos y a mis hermanitas les dedico, igualmente,
por hacerme ver mis errores, ayudarme en
todo lo que pueden y sobretodo
por ser parte de mi vida.*

*Fanny, Rocío, Ariadna, Erika, Marco, Gabriela,
Leticia, Aurora, Samuel, Ulises y Alejandro
se les dedica una parte de esta tesis por
darme su apoyo y motivación,
su amistad es única.*

*Q.F.B María Lourdes Vega Navarrete,
Q.F.B. Francisco Javier Parada García,
Bíol. Dora Villegas Carmona
han sido las personas más allegadas
ha este trabajo y con su instrucción,
asesoramiento y consejos se pudo
realizar el mismo.*

*Por su apoyo y asesoramiento en el análisis
estadístico se le agradece enormemente
a la M. en C. Margarita Cruz Millán, y a
la M. en C. Leonor Aguilar Santelises
por ser quien nos contacto con ella.*

*Se agradece al Centro de Estudios e Investigaciones ANIGEN
así como al Sr. Jorge Antonio Zogbi por prestar sus
instalaciones para hacer el desarrollo
experimental del presente trabajo.*

*Agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México porque
ella es quien me ha formado profesionalmente y que por ella presento
este trabajo, y también por ser el lugar donde crecí y
conocí a algunos de mis mejores amigos.*

*COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO DE
EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RESTOS
ÓSEOS HUMANOS POR EL MÉTODO DE
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y UN MÉTODO
DE EXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA
APLICADOS EN LA IDENTIFICACIÓN HUMANA*

Índice

Resumen	2
Introducción	4
Marco teórico	5
Historia del uso de los exámenes de identificación humana por medio del ADN	5
La secuencia de ADN como herramienta en la Investigación forense	6
Extracción de ADN	6
Purificación de ADN con <i>DNA IQ System</i> [®]	8
Purificación de ARN con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®]	9
<i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] -Modificado	10
Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico	11
Reacción en Cadena de la Polimerasa	11
PCR en Tiempo Real (qPCR)	15
Electroforesis Capilar	18
Interpretación del perfil genético	20
Sistema Óseo	21
Estructura de los huesos	22
Histología del hueso	23
Tejido óseo compacto	25
Tejido óseo esponjoso	26
Cartílago	27
Planteamiento del Problema	29
Objetivos	30
Hipótesis	31
Diseño de investigación	32
Tipo de estudio	32
Población de estudio	32
Criterios	32
Material y Métodos	33
Material	33
Reactivos	33
Instrumentos	34
Equipos	34
Método	35
Diagrama de Flujo de Método General	41
Resultados	42
Discusión	60
Conclusiones	64
Referencias	65
Anexos	68
A. Tablas de Cuantificación obtenidas con <i>Plexor HY System</i> [®]	68
B. Perfiles Genéticos	73

Resumen

Con la introducción de los métodos basados en biología molecular, en especial el análisis de ADN (ácido desoxirribonucleico) aplicado en la identificación humana, las ciencias forenses han tenido un gran reto en la implementación de nuevas técnicas, más rápidas, de bajo costo y con mayor rendimiento de extracción de ADN. El sustrato más complicado y laborioso de analizar ha sido el de muestras de tejido óseo, debido a su compleja estructura diseñada a base de una matriz mineralizada.

Por otro lado, el análisis de hueso siempre es la última opción a trabajar cuando se han agotado fluidos corporales o tejidos blandos o bien, no existe la posibilidad de recuperarlos, por lo que el tejido óseo será la única opción en los casos de desastres en masa, guerras, restos de personas perdidas, incendios y exhumaciones; muestra que expuesta a los factores ambientales extremos exhibe un daño severo en el ADN, lo que complica su tipificación para propósitos de identificación humana.

Por lo anterior, en el presente trabajo el objetivo fue evaluar el rendimiento de ADN extraído a partir de tejido óseo con los métodos *DNA IQ System*[®] y *SV Total RNA Isolation System*[®] modificado, verificar si el extracto se encuentra libre de inhibidores de la PCR y determinar si la desproteización posterior a la digestión de la muestra, influye en el rendimiento del ADN obtenido al aplicarla a los métodos de extracción antes mencionados.

Para esto se analizaron 10 restos óseos humanos utilizando los métodos de extracción *DNA IQ System*[®] y *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado, para extraer el ADN, y para la desproteización se utilizó la mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico. Para la cuantificación del ADN recuperado se utilizó el kit *Plexor HY System*[®]. Para amplificar los 16 loci (*short tandem repeat*, STR) fue utilizado el kit *PowerPlex 16 System*[®]. Por último para obtener el perfil genético, se utilizaron un estándar de peso molecular y un marcador alélico para el panel aplicado en el equipo ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer[®].

Los resultados obtenidos de estos diez restos óseos, permitieron determinar el perfil genético completo, por el método *SV Total RNA Isolation System*[®] modificado con desproteización, que fue, de los métodos utilizados, el que mayor rendimiento tuvo, a pesar de tener un 25% de presencia de inhibidores de las muestras trabajadas. Con los otros métodos utilizados, *DNA IQ System*[®] con desproteización o bien sin desproteización, *SV Total RNA Isolation System*[®] –

Modificado sin desproteinización, permitieron determinar 2, 3 y 2 perfiles genéticos, respectivamente.

Los resultados anteriores permiten concluir, que de los métodos utilizados, *SV Total RNA Isolation System*[®] modificado con desproteinización, fue el más eficaz para llevar a cabo la extracción de ADN en cantidad suficiente para propósitos de identificación molecular humana basada en la obtención del perfil genético.

Introducción

La identificación humana por medio del análisis de ADN a partir de restos óseos es un proceso difícil y laborioso con muy pocos resultados satisfactorios. Sin embargo; la aplicación de este análisis es de gran ayuda en aquellos casos en los cuales no se tiene otro tipo de muestra para el estudio e identificación de la persona desaparecida.

El hueso es uno de los tejidos más difíciles de trabajar, debido a que está compuesto por una matriz mineral que contiene embebidas células nucleadas, situación que complica la extracción de ADN sin dañarlo. Adicionalmente, el hueso sufre, en la mayoría de las ocasiones, alteraciones por estar expuesto a diversos factores ambientales como la luz UV, la humedad, contaminantes químicos y biológicos provenientes principalmente del suelo, varios de ellos con efectos importantes en la integridad del ADN. A pesar de que existen diversos métodos para extraer el ADN de huesos humanos, muchos de ellos llevan demasiados pasos para desmineralizarlo; otros son muy costosos y su rendimiento en cuanto a la cantidad de ADN es muy bajo, y otros más no eliminan en su totalidad los inhibidores de la Polimerasa para la PCR, paso esencial que permite la amplificación de las regiones de interés en la determinación del perfil genético de un individuo.

En México el estudio de ADN a partir de restos óseos está poco extendido debido a la complejidad de la técnica, son pocas las instituciones que hacen este tipo de análisis. El análisis que nos ocupa, es de gran importancia, en diversas áreas, como la Forense, Antropología, Paleontología, Medicina, entre otras más.

Al hacer esta determinación se pretende establecer un procedimiento con un menor número de pasos ocupados en la extracción de ADN de esqueletos humanos, que produzca un buen rendimiento del producto, a fin de amplificar las regiones del genoma polimórficas que comúnmente son analizadas para la identificación humana.

Dada la creciente ola de criminalidad que vive nuestro país y las cada vez más sofisticadas formas de actuar de los delincuentes, es necesario contar con un método rápido y eficaz de identificar a las víctimas a partir de material biológico que resista todo intento de borrar huella del hecho delictuoso, por ejemplo, el tejido óseo. En la medida en que más rápido se obtengan resultados, más oportunidad habrá de ligar al probable responsable con el hecho delictuoso que se investiga.

Marco teórico

Historia del uso de los exámenes de identificación humana por medio del ADN

La historia de los estudios de identificación en el campo forense, iniciaron con los análisis del sistema de grupo sanguíneo AB0. Posteriormente aparecieron otros métodos, basados en el registro de las variaciones presentes en las proteínas séricas, enzimas y glóbulos rojos, determinaron nuevos marcadores que permitieron establecer identidad de un sujeto. Más recientemente, fueron usados los sistemas de antígenos en leucocitos humanos. Hace un poco más de 20 años que Sir Alec Jeffreys, profesor y genetista de la Universidad de Leicester en el Reino Unido, comenzó a utilizar los exámenes de identidad basados en el ADN.

Jeffreys estaba interesado en el estudio de las variaciones genéticas entre los individuos y él hizo algunos de los primeros trabajos para detectar diferencias genéticas en humanos (1).

Por medio del análisis del ADN, se puede identificar a una persona, y diferenciarla del resto. Cada ser humano es diferente; dos personas pueden ser más o menos parecidas, sobre todo entre familiares cercanos, pero nunca son idénticas, salvo el caso de los gemelos homocigotos (y aun éstos tienen un factor que los distingue a uno del otro). Esta diferenciación entre las personas se debe a que existen millones de posibles combinaciones de ADN que se producen durante la espermatogénesis y ovogénesis como consecuencia del fenómeno de recombinación genética que se produce durante la meiosis (2).

La mayor parte de la secuencia de nucleótidos del ADN, alrededor del 99.5%, es idéntico entre las personas, y el objetivo de la genética forense es diferenciar a las personas basándose en el 0.5% polimórfico restante del genoma.

A fin de que sea de utilidad como herramienta, el polimorfismo del ADN debe tener como característica para poder ser aplicado en el ámbito forense lo siguiente:

- Altamente polimórficos (que haya una gran variación entre individuos)
- Que su caracterización sea fácil y barata.
- Que sea fáciles de interpretar.
- Que tenga una baja frecuencia de mutación.
- Que los resultados deben ser fáciles de comparar entre laboratorios (3).

La secuencia de ADN como herramienta en la Investigación forense

Las huellas de ADN o tipificación (perfil) de ADN, como es conocido ahora, fue descrito en 1985 por el genetista inglés Alec Jeffreys. Él encontró que ciertas regiones del ADN contenían secuencias repetidas, una y otra vez, una a lado de otra. También descubrió que el número de secciones repetidas presentes en una muestra, puede diferir de individuo a otro. Al desarrollar una técnica para examinar la variación de longitud de estas secuencias repetidas en el ADN, el Dr. Jeffreys creó la habilidad para desarrollar los exámenes de identificación humana.

Estas regiones repetidas en el ADN se conocen como Repeticiones en Tandem de Número Variable (VNTR). La técnica usada por el Dr. Jeffreys para examinar los VNTRs fue llamada Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), porque está involucrado el uso de una enzima de restricción que corta a las regiones de ADN circundantes a los VNTRs. Este método de RFLP fue usado inicialmente para ayudar en el caso de un inmigrante Inglés y después para resolver el caso de un doble homicidio. Desde entonces, los exámenes de identificación humana usando métodos de tipificación de ADN han ido en aumento. En los últimos 15 años, se ha visto un tremendo crecimiento en el uso del ADN como evidencia en las investigaciones en el lugar de los hechos de un delito, así como exámenes para verificar la paternidad de un individuo. Hoy en día más de cientos de laboratorios forenses públicos y varias docenas de laboratorios de estudios de paternidad realizan miles de exámenes anualmente en el mundo. (4).

Extracción de ADN

El ADN puede ser extraído de muchos tipos de material biológico. Los más comúnmente utilizados son: huesos, sangre o manchas de ella, semen y manchas de fluido seminal, tejidos, órganos, dientes, cabello, uñas, saliva, orina, entre otros fluidos biológicos (5).

El éxito de la tipificación del ADN depende que la muestra tenga: la cantidad suficiente, con buena calidad y pureza que se logre, posterior al ensayo analítico y que éste pueda ser llevado efectivamente. Es de esperarse que un protocolo de extracción sea simple y barato.

Los procedimientos comunes de extracción de ADN pueden ser: con disolventes orgánicos, con métodos de desalinización y con resinas de intercambio iónico. Los procedimientos orgánicos de extracción originan productos de ADN altamente purificados. Cuando se usan filtros específicos, es

posible que también se remuevan a los inhibidores de las enzimas que se utilizan en el proceso (6).

La extracción de ADN a partir de material calcificado es más difícil e involucra la maceración previa de los materiales para pulverizarlos, antes de que el material celular pueda ser disuelto en una disolución acuosa, además de realizar la remoción manual de los contaminantes ambientales, y eliminar por métodos físicos o químicos a los contaminantes. Concluido el procedimiento descrito, los pasos siguientes son similares a la extracción de ADN de otros tipos de muestras (3,7).

Los inhibidores de la PCR generalmente ejercen sus efectos a través de la interacción directa con el ADN o interferencia con la ADN polimerasa termoestable. El vínculo directo de los agentes con las hebras de ADN puede impedir la amplificación y facilitar la co-purificación de inhibidores y ADN. Los inhibidores pueden interactuar con la DNA polimerasa bloqueando la actividad enzimática. La DNA polimerasa requiere del cofactor que puede ser objeto de inhibición. El magnesio es un cofactor crítico, y los agentes que reducen la cantidad de Mg^{+2} disponible o interfieren con la unión de éste a la ADN polimerasa, pueden inhibir la PCR (8).

Aunque existen diferentes procedimientos para realizar la extracción de los ácidos nucleicos, varios pasos esenciales son comunes. Primero, se necesita el material inicial que puede ser un cultivo bacteriano, o de células eucarióticas, que pueden ser separadas del medio de crecimiento, o de un tejido que debe ser homogenizada para que las células se lisen.

El segundo requerimiento es que el ADN esté libre de otros compuestos celulares. Es necesario realizar lisis de la membrana plasmática para liberar los componentes, el procedimiento puede variar según el tipo de célula que se manipule.

Luego de la lisis celular, es necesario separar el ácido nucleico deseado de los demás componentes celulares. Dentro de las estrategias técnicas empleadas para tal fin, se encuentran: el tratamiento enzimático, la purificación con el sistema fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, la precipitación con alcohol, la separación mediante un gradiente de concentración de glucosa por medio de centrifugación, la desnaturalización alcalina y la purificación en columna.

El tratamiento enzimático, emplea RNA-asa para remover el RNA del ADN. La RNA-asa es termoestable, lo que permite hacer un tratamiento con calor para eliminar las posibles ADN-asas presentes en la enzima. Para eliminar la contaminación por proteínas, se emplea la proteinasa K, que tiene una amplia actividad proteolítica.

La remoción de proteínas es importante, para evitar que puedan interferir con los procedimientos subsecuentes, debido a que algunas de ellas tienden a adherirse a los ácidos nucleicos y degradarlos.

En la centrifugación a velocidad moderada, se emplea, para la purificación de ADN, una disolución, que permite remover los restos celulares. Frecuentemente, se emplean en los procedimientos de purificación del ADN, columnas de centrifugación (*spin columns*).

En la cromatografía de selección de tamaño de poro, la muestra se pasa a través de una matriz de microporos, las moléculas pequeñas (como sales y nucleótidos) pueden insertarse dentro de la matriz, mientras que las moléculas más grandes (como cadenas largas de ácidos nucleicos) no pueden atravesar el enmallado de la columna. En la purificación por afinidad cromatográfica, las macromoléculas en la muestra se unen a la resina de la columna. Esta puede ser una resina aniónica, que se une a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (cargados negativamente).

Las cantidades típicas de ADN que pueden ser recuperadas de diferentes muestras biológicas son las siguientes (4,9,10):

Tipo de muestra	Cantidad de ADN*
Sangre líquida	20,000-40,000 ng/mL
Mancha de sangre	250-500 ng/cm ²
Semen líquido	150,000-300,000 ng/mL
Hisopo de exudado vaginal post-coital	10-3000 ng/hisopo
Pelo arrancado (con raíz)	1-750 ng/raíz
Pelo desprendido (con raíz)	1-10 ng/raíz
Saliva líquida	1000-10,000 ng/mL
Hisopo de raspado bucal	100-1500 ng/hisopo
Orina	1-20 ng/mL
Hueso	3-10 ng/mg
Tejido	50-500 ng/mg

*Tanto la calidad como la cantidad de ADN recuperado de las muestras pueden ser significativamente afectadas por los factores ambientales.

Purificación de ADN con **DNA IQ System**[®]

El DNA IQ System[®] usa una resina paramagnética para aislar el ADN. El proceso requiere de sólo dos pasos aún para las muestras muy pequeñas. Para material biológico sobre soporte sólido, el primer paso a desarrollar es fácil, rápido, eficiente y casi universal para el método de extracción y es separar la

muestra del soporte. Este paso es innecesario para muestras líquidas. El segundo paso usa la resina paramagnética para purificar el ADN sin requerir lavados exhaustivos para remover el reactivo de lisis. Este sistema está diseñado para purificar cantidades pequeñas de ADN y generar productos consistentes para un tipo de muestra específica. Uno de los tipos de muestras de la cual se ha aislado ADN usando este sistema es hueso, pero se requiere utilizar el Bone Incubation Buffer[®] y que el hueso esté pulverizado (11,12).

Con respecto a la cantidad de ADN extraído de huesos, los protocolos de muestreo prefieren las muestras de tejido de hueso compacto sobre los huesos esponjosos (13,14).

El comportamiento paramagnético se produce cuando el campo magnético aplicado alinea todos los momentos magnéticos ya existentes en los átomos o moléculas individuales que componen el material. Esto produce un momento magnético global que se suma al campo magnético. Los materiales paramagnéticos suelen contener elementos de transición o lantánidos con electrones desapareados. El paramagnetismo en sustancias no metálicas suele caracterizarse por una dependencia de la temperatura: la intensidad del momento magnético inducido varía inversamente con la temperatura. Esto se debe a que al ir aumentando la temperatura, cada vez resulta más difícil alinear los momentos magnéticos de los átomos individuales en la dirección del campo magnético (15,16).

El procedimiento del DNA IQ System[®] se desarrolla usando algunos pasos muy sencillos:

1. Lisis de la muestra.
2. Captura del ADN usando la resina.
3. Lavado de la resina.
4. Elución del ADN de la resina (17,18).

Purificación de ARN con *SV Total RNA Isolation System*[®]

El éxito del aislamiento del ARN intacto requiere de cuatro pasos esenciales: la ruptura efectiva de las células y tejidos, la desnaturalización de los complejos nucleoproteínicos, la inactivación de ribonucleasas endógenas (ARNasa) y la remoción de la contaminación de ADN y proteínas. El paso más importante es la inactivación inmediata de las RNAsas endógenas que son liberadas de las membranas de los organelos al romperse las células.

El *SV Total RNA Isolation System*[®] combina las propiedades perjudicial y protectora del tiocianato de guanidina (GTC) y el beta-Mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en los extractos celulares. El GTC, en

asociación con el SDS (Dodecilsulfato sódico), actúa rompiendo los complejos nucleoproteínicos, permitiendo que el ARN se libere dentro de la disolución y se libere de las proteínas. La dilución de los extractos celulares en presencia de una concentración alta de GTC causa una precipitación selectiva de proteínas celulares, mientras que el ARN queda disuelto. Después de la centrifugación, el RNA es selectivamente precipitado de la solución con etanol y atado a la superficie de la sílica de fibra de vidrio que se encuentra en el *Spin Basket*. Cada *Spin Column Assembly* consiste de un *Spin Basket* y un tubo colector de 2mL. Para que el lisado se aclare efectivamente de las proteínas precipitadas y de los desechos celulares, estos lisados pueden ser unidos al *Spin Basket* ya sea por centrifugación o por filtración al vacío. La reacción de unión ocurre rápidamente debido a la interacción de las moléculas de agua con las sales caotrópicas, esto favorece la adsorción de los ácidos nucleicos a la sílica. La DNasa I libre de RNasas son aplicadas directamente sobre la membrana de sílica para que digiera la contaminación de ADN genómico. El RNA total unido es purificado adicionalmente de sales contaminantes, proteínas e impurezas celulares, con un simple paso de lavado. Finalmente, el RNA total es eluido de la membrana por la adición de agua libre de nucleasas. Este procedimiento produce una fracción esencialmente pura de RNA total después de una sola ronda de purificación sin extracciones orgánicas o precipitaciones. El procedimiento es fácil de realizar con pequeñas cantidades de tejido, sangre o cultivos celulares; y este puede ser usado para procesos de múltiples muestras (19).

***SV Total RNA Isolation System*[®]-Modificado**

El *SV Total RNA Isolation System*[®], se basa principalmente en la aplicación de una membrana de sílica que puede ser usada con centrifugación o sistema de vacío. Con este método los ácidos nucleicos aislados se consiguen sin extracciones orgánicas, y se emplea un paso de extracción con DNasa para eliminar el ADN presente (21).

Al eliminar los pasos donde interviene la adición de DNasa, se consigue la extracción de ADN por medio de este sistema, debido a que tanto el ADN junto con el ARN quedan atrapados en la membrana de sílica, permitiendo hacer lavados para purificar estos ácidos nucleicos y después de ser purificados es fácil la separación de la membrana eluyendo con agua libre de nucleasas.

Las membranas *SV (Spin Vacuum)* son membranas adecuadamente impregnadas de sílica adecuadamente para unir los ácidos nucleicos en presencia de caotrópicos. Las membranas *SV* están disponibles en pequeñas canastas para uso en preparaciones individuales, ya sea en centrifugación o sistema de vacío con adaptadores correspondientes. El rendimiento con estos

sistemas individuales está limitado solamente por la capacidad del rotor de la microcentrifuga o de la capacidad del colector del sistema de vacío. Para superar la tasa de producción, las membranas SV han sido escaladas a un sistema de 96 pozos. Cada pozo de la charola, tiene las mismas características y la misma capacidad que el sistema individual de las membranas SV. Promega® (fabricante de este dispositivo), ha combinado estas membranas con una variedad de reactivos para crear una gran línea de sistemas de aislamiento específicamente de ácidos nucleicos de varias fuentes.

La purificación de ADN genómico es el resultado de la tecnología de las membranas SV permite aislar a los ácidos nucleicos totales a partir de la captura directa del lisado de células o de tejidos. Esta tecnología se adaptó para la purificación de ADN genómico obtenido de sangre, raspado bucal, tejidos de mamíferos y cultivos celulares. Por otra parte, el protocolo puede ser modificado para ser usado en el aislamiento de ADN o de ARN y al mismo tiempo separarlos a ambos. (20,21)

Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico

Es un método clásico de extracción, se realiza con disolución amortiguadora neutral o alcalina de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) que es inmisible en agua, por lo que forma dos capas (fases) cuando se adicionan al extracto celular. Cuando la mezcla es agitada vigorosamente, las proteínas son desnaturalizadas y ubicadas en el sobrenadante de la interfase, mientras que los ácidos nucleicos se encuentran en la fase líquida. Si por el contrario, la extracción se realiza con fenol ácido (en el que no se realiza el amortiguamiento con alcohol isoamílico), el ADN se ubica en la fase orgánica en tanto que, las proteínas se encuentran en el sobrenadante de la interfase y el ARN se encuentra en la fase superior que es la acuosa.

Luego de la extracción con fenol, se obtiene una muestra del (los) ácido(s) nucleico(s) libre(s) de proteínas. El producto obtenido puede contener algunas trazas de fenol y/o cloroformo que pueden desnaturalizar las enzimas empleadas en los pasos sucesivos (9,22).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), descrita por Kary B. Mullis, en 1985. Es una técnica que imita la forma en que la naturaleza lleva a cabo la replicación del ADN. Se sabe que la

polimerasa de ADN de especies bacterianas que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90°C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de ADN. Mullis y colaboradores aprovecharon esta enzima para desarrollar la técnica de PCR (23).

El objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN o indirecta de un ARN (en este caso de su ADN complementario o cDNA), presentes en mezclas de muy diversas fuentes sin necesidad de una purificación previa de la muestra íntegra original. Sin embargo, debe resaltarse que es un requisito imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de ADN o RNA que se quiere amplificar (salvo en el caso de algunas variantes del método clásico, como PCR inversa). Por estas características, en especial la capacidad de amplificación, la PCR es un método muy adecuado para preparar ácidos nucleicos en una cantidad muy superior a la de la muestra original, tanto como método de clonación celular como para la detección.

Las aplicaciones de la PCR son muy numerosas y variadas. Como ejemplos pueden citarse: clonación celular de fragmentos de ADN, detección de secuencias sin purificación previa, secuenciación de ácidos nucleicos, establecimiento de polimorfismos de secuencia, rastreo de mutaciones, tipificado de ADN para trasplantes, diagnóstico de enfermedades genéticas, prenatales o no, determinación de secuencias específicas de ADN relacionadas con situaciones patológicas definidas, resolución de problemas forenses o arqueológicos, estudios evolutivos, detección de microorganismos infecciosos, detección de células tumorales, etc.

Principio del Método

La PCR no es una técnica analítica *per se*, sino más bien una metodología resultante de la aplicación práctica de tres conceptos:

- Desnaturalización del ADN para dar hebras sencillas.
- Hibridación específica de la hebra sencilla con un oligonucleótido. También se denomina etapa de templado (entendido como disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas tras la desnaturalización térmica; en inglés, *annealing*). Esta es la etapa que explica por qué se debe conocer parte de la secuencia.
- Replicación de la hebra sencilla por una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido anterior, como cebador: también, elongación o extensión del cebador, o polimerización.

Mediante la aplicación en forma cíclica de estos tres procesos se consiguen múltiples copias del fragmento de ácido nucleico en un corto espacio de tiempo.

A pesar de esta aparente complejidad, en teoría es un método sencillo, y relativamente rápido para amplificar secuencias. En la práctica, se requiere un control preciso de las variables que condicionan este triple proceso (secuencia diana, cebador, enzimas y resto de componentes), además de instrumentos adecuados (termocicladores de ADN) para establecer las condiciones de cada etapa y repetirlas cíclicamente (tiempo, temperatura, número de ciclos, etc). Se consigue así amplificar secuencias de tamaños diversos, comprendidos entre 50pb y 2,5kb.

Para la realización práctica se requieren en la mezcla de reacción los siguientes "reactivos":

- Los cuatro dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), en exceso, como sustratos para la síntesis de las innumerables copias de ADN. Para ser reconocidos por la polimerasa, deben ir acompañados de Mg^{2+} .
- Dos oligonucleótidos de cadena sencilla (que coloquialmente se conocen como, "oligos"), generalmente sintéticos, de 18 a 30 nt. Sus secuencias han de ser complementarias, respectivamente, a los dos extremos 3' de la región diana, uno en cada hebra, de modo que los oligos puedan funcionar como cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana. Por esta razón no se puede amplificar una región de ADN si no se conoce la secuencia de sus dos extremos. De hecho, es la posición donde hibridan los cebadores la que define la longitud del fragmento que se amplifica es decir la secuencia diana (cada hebra de ADN está compuesta de una secuencia de nucleótidos los cuales están unidos mediante puentes fosfodiéster entre el grupo 5' hidroxilo de un nucleótido y el grupo 3' hidroxilo del siguiente, la posición 5' y 3' hacen referencia a la posición de los carbonos dentro de la molécula de pentosa de cada nucleótido).
- Una polimerasa termoestable, es decir, enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (al menos 75°C, y estable con frecuencia hasta 95°C). Esta característica permite su actuación en ciclos sucesivos sin inactivarse; además, la replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente desapareados y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso. La enzima más empleada se llama Polimerasa Taq, por proceder de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en manantiales de agua caliente. Esta enzima tiene el inconveniente de carecer de la actividad correctora de pruebas (exonucleasa 3'), por lo que la frecuencia de errores es superior a la de la replicación (alrededor de un error por cada 5,000 nucleótidos

incorporados) de ahí que en ocasiones se sustituya por otras DNA polimerasas termoestables.

Etapas del proceso

Cada ciclo de una PCR consta de tres etapas:

1. Desnaturalización: calentamiento para la separación de las dos hebras del ADN, mediante una incubación breve (30-120 s) a una temperatura entre 88 y 97°C, que debe ser superior a la de fusión (T_m) de la región de ADN que se quiere amplificar.
2. Templado (o hibridación): enfriamiento rápido por debajo de T_m de forma que se permite la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los oligos cebadores. Generalmente se usan temperaturas de 37 a 65°C que se mantienen entre 10 y 120s.
3. Elongación (o replicación): etapa de amplificación propiamente dicha (72-75°C, 1-3 min), en la que la DNA polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5' → 3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización (siguiente ciclo).

Además de las tres etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, a elevada temperatura (incluso superior a la de las etapas de desnaturalización), sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si éste es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas (como en el caso de un ADN genómico completo). La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos.

La muestra de partida, está formada por moléculas de ADN de mayor tamaño que la región diana, solo a partir del tercer ciclo aparecen copias exactas de la diana. Si la muestra de partida hubiese sido el propio fragmento diana, todas las copias aparecidas desde el primer ciclo, serían iguales a éste. Además de la amplificación global, por aumento del número de moléculas de ADN, debe notarse cómo el número de copias de la diana aumenta más rápidamente que el de otras copias más largas. Todo ello hace que en la mezcla final, al terminar la PCR, los fragmentos diana superan abruptamente en número a cualquier otro tipo de fragmento, incluyendo obviamente las moléculas de ADN originales de la muestra (que no han sido amplificadas). El grado de amplificación que se consigue es de un millón de veces en 20 ciclos y

un billón en 40 ciclos. Esto es lo que permite aplicar la PCR a muestras poco purificadas y analizar los resultados directamente, en los que sólo se podrá detectar el fragmento amplificado (24).

PCR en Tiempo Real (qPCR)

Los análisis de múltiples reacciones de las repeticiones cortas en tandem (STR) han sido la tecnología dominante en la identificación humana basada en el ADN. Si bien es altamente informativo, estos ensayos requieren un intervalo definido de cantidades de ADN molde para producir resultados óptimos. Por lo tanto, la habilidad para evaluar con precisión la cantidad y calidad del ADN extraído han ido incrementando de manera importante. La cuantificación de ADN específico de varón también ha sido necesaria con la llegada de los exámenes forenses de Y-STR. Todo esto puede ser dirigido a un sistema de PCR cuantitativa.

Los métodos de cuantificación común basados en la hibridación producen niveles incrementados de resultados falsos negativos (debido a la falta de sensibilidad) o conclusiones subjetivas (debido a la comparación visual de la intensidad de las bandas). Los métodos de cuantificación basados en amplificación proporcionan un alto nivel de sensibilidad, y los métodos con PCR en tiempo real pueden dar un intervalo dinámico que supera a otros métodos.

El producto numérico de PCR cuantitativa también incrementa la objetividad de la interpretación de los datos.

Tecnología Plexor®

Este es un nuevo método de PCR en tiempo real que toma la ventaja de la interacción específica entre dos nucleótidos modificados para lograr el análisis cuantitativo. Dos bases modificadas, isoguanina (iso-dG) y la 5'-metilisocitosina (iso-dC), forman un único par de bases en la doble hebra de ADN (Figura 1). Para realizar la PCR cuantitativa fluorescente usando esta nueva tecnología, uno de los oligos es sintetizado con un residuo iso-dC como nucleótido 5'-terminal y una etiqueta fluorescente en la posición 5'-final; el segundo primer no está etiquetado. Durante la PCR, el primer etiquetado se alinea y extiende, volviéndose parte del templete que se usará durante las siguientes rondas de amplificación. Durante las subsecuentes rondas de amplificación, el complementario iso-dGTP, el cual está disponible en la mezcla de nucleótidos como dabcil-iso-dGTP, se apareará específicamente con el iso-dC. Cuando el dabcil (*quencher* o apagador) es incorporado a la nueva hebra de ADN, su proximidad con el marcador fluorescente que se encuentra sobre la hebra opuesta hace que se apague la señal.

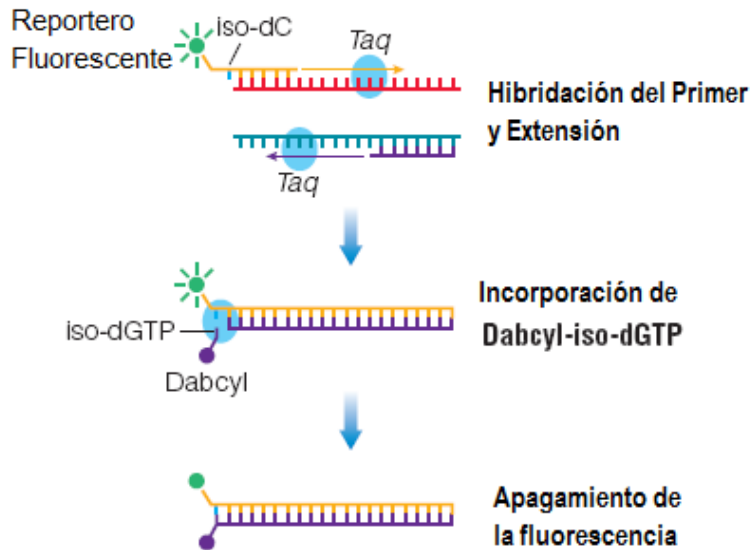


Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra el proceso del Plexor real-time PCR. (Modificado de www.promega.com/plexorresources/, consultado: Enero de 2009)

Para el acoplamiento directo de la detección de la fluorescencia y los ciclos térmicos, lo que se mide en PCR en tiempo real, son los cambios en la señal de la fluorescencia (en unidad(s) relativa(s), o RFU por sus siglas en Inglés) en cada ciclo. El nivel de fluorescencia en las reacciones iniciales de los oligos etiquetados es alto en el Sistema Plexor[®]. Con los productos acumulados de la amplificación, la señal decrece. Los datos de amplificación presentan una curva característica tri-fase.

La parte de la curva con el cambio de señal más alto, es la fase exponencial, que es la fase más consistente y es usada para estimar la cantidad de material inicial. Un umbral de amplificación, es el conjunto dentro de la fase exponencial, con el nivel de fluorescencia en el que todas las curvas de amplificación, exhiben en su mayoría una señal significativa decreciente. El punto en el cual una curva de amplificación cruza este umbral, se le llama umbral de ciclo de la muestra (C_t), cuyos valores de para una serie de diluciones de una muestra con una cantidad de ADN conocido son usados para generar una curva estándar, que se utiliza para cuantificar muestras con cantidades desconocidas de ADN.

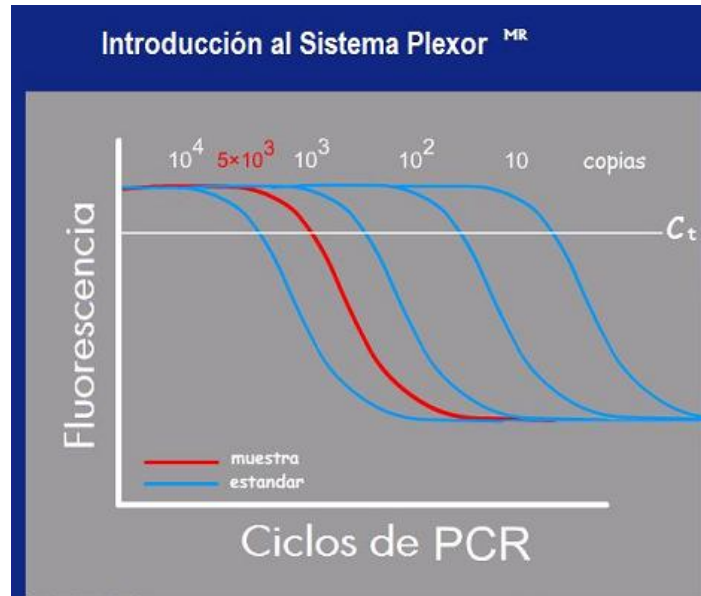


Figura 2. La cantidad de ADN puede ser cuantificada haciendo la comparación con los resultados obtenidos de la curva estándar generada con diluciones de ADN de concentración conocida. (Modificado de www.promega.com/plexorresources/, consultado: Mayo de 2009)

El apagado del marcador fluorescente por el dabcil es un proceso reversible. La fluorescencia es apagada cuando el producto está en doble hebra, debido a la gran proximidad entre el dabcil y el marcador fluorescente. La desnaturalización del producto separa al marcador y al dabcil, que resulta en un incremento en la señal de la fluorescencia. Consecuentemente, las curvas de temperatura de fusión pueden ser generadas, al permitir que todo el producto que está en forma de ADN de doble hebra baje de temperatura (aproximadamente 60°C) y lentamente se eleve para la desnaturalización (aproximadamente a 95°C).

La curva de fusión se determina trazando los cambios de fluorescencia con relación a la variación de temperatura, calculando el cambio más grande en la fluorescencia con la derivada ($dRFU/dT$) de la temperatura de fusión (T_m). La longitud del producto y la secuencia tienen impacto sobre T_m , así la curva de fusión es usada para caracterizar la homogeneidad de los productos de PCR. La amplificación no específica puede ser identificada por la presencia de picos amplios en la curva de fusión o por picos con diferente valor de T_m . Para distinguir productos de amplificación específicos y no específicos, la curva de fusión añade un aspecto en el control de calidad durante la rutina del uso de ensayos de validación o prediseño.

Un beneficio de la tecnología del *Plexor*[®] sobre la detección usando ADN de una sola hebra unida a un colorante, tal como el *SYBR Green*[®], es la capacidad de amplificar diferentes regiones al mismo tiempo con la ventaja de

poder diferenciar cada una gracias al uso de varios colorantes a la vez, conocido como *multiplexing*. El oligo etiquetado puede lograrse con alguno de los marcadores fluorescentes más comúnmente usados en el PCR fluorescente, esto permite usar de dos a cinco colores (*multiplexing*), que depende del instrumento que se utilice. La simplicidad del primer diseñado por la tecnología del *Plexor*[®], es una ventaja distinta sobre la propuesta de PCR cuantitativa basada en sondas que son hidrolizadas durante el proceso de amplificación (25,43,44,45).

La Fluoresceína del Sistema *Plexor HY*[®], se usa para detectar el blanco de ADN humano autosomal. Los oligos amplifican regiones multicopia, del tamaño de 99pb ubicados sobre el cromosoma 17. Los datos de esta reacción, son usados para cuantificar la cantidad de ADN total en una muestra.

El fluoroforo *CAL Fluor*[®] *Orange 560* del Sistema *Plexor HY*[®], es usado para detectar el ADN blanco en el cromosoma Y. Los oligos amplifican en regiones multicopia del tamaño de 133pb sobre el cromosoma Y. Los datos de esta reacción son usados para cuantificar la cantidad de ADN total en una muestra.

El fluoroforo *CAL Fluor*[®] *Red 610* del Sistema *Plexor HY*[®], es usado para detectar el Control Interno de PCR (IPC), el cual es adicionado en todas las reacciones. El producto de amplificación es de 150 pares de bases. Los datos de este blanco son usados para monitorear la inhibición de las muestras amplificadas.

El fluoroforo IC5 del Sistema *Plexor HY*[®], es usado como una referencia pasiva. El reactivo marcado con el IC5 está adicionado a la mezcla de reacción de todas las muestras. Los datos de los tres canales de amplificación (Fluoresceína, *CAL Fluor*[®] *Orange 560*, *CAL Fluor*[®] *Red 610*) pueden ser normalizados con esta señal.

El Sistema *Plexor HY*[®] usa una química *hot-start* lo que significa que la polimerasa, para ser activada, debe ser antes calentada a 95°C durante 2 minutos. Las mezclas de reacciones pueden ser realizadas a temperatura ambiente y se pueden adaptar para la automatización (25,26,27,28,41).

Electroforesis Capilar

Los productos de PCR de las repeticiones cortas en tándem del ADN pueden ser separados de tal manera que permite que cada alelo se distinga de otros más. Los alelos heterocigóticos son determinados de esta manera, con un método de separación basada en la carga y en el tamaño conocido como

electroforesis. En la electroforesis el medio de separación puede estar, ya sea dentro de una placa de gel o bien dentro de un capilar. La palabra electroforesis viene del Griego *electron* (carga) y del Latín *phore* (correr). Así el proceso de electroforesis se refiere al acarreamiento de las moléculas debido a sus cargas eléctricas y a su masa. En el caso del ADN, los grupos fosfato sobre su esqueleto al donar sus iones H^+ , le confieren carga negativa. Bajo la influencia de un campo eléctrico, las moléculas de ADN que migraran en dirección del ánodo. Con voltaje alto, cuanto mayor es la carga las moléculas de ADN más rápidamente se moverán.

El movimiento de los iones en un campo eléctrico genera calor que puede ser disipado o absorbido por el sistema. Si el calor es excesivo puede causar que en el gel se generen bandas en forma de sonrisa o "*smile*" o en muchos de los casos el gel puede literalmente fundirse y derramarse. La electroforesis en capilar es una ventaja porque puede ser más fácilmente disociado por el capilar, el cual tiene una gran superficie de radio área-volumen.

La electroforesis capilar (CE) es una incorporación relativamente nueva de las técnicas basadas en la migración molecular debida a la relación carga/masa. La primera separación de ADN por CE fue desarrollada justo en la década de 1980s. Desde la introducción de una nueva instrumentación de CE a los mediados de 1990s, la técnica ha ganado popularidad rápidamente.

El elemento principal del instrumento de CE incluye un arreglo capilar, dos recipientes de buffer, y dos electrodos conectados a una fuente de poder de alto voltaje. El sistema de CE cuenta también con una fuente de láser de excitación, un detector de fluorescencia, un sistema para tomar las muestras de los tubos y una computadora para el control de la inyección y detección de la muestra (3).

Con estos aspectos analíticos de la tipificación forense del ADN, con la ayuda de la CE, se puede aplicar esta tecnología a los casos forenses y las bases de datos de ADN.

Esta tecnología ha sido aplicada en el campo de la investigación forense, porque ha sido rigurosamente validada. Para esto se involucra el análisis de las Repeticiones Cortas en Tándem (STR, o *Short Tandem Repeat*) muchos de los parámetros que deben ser determinados, se basan en el sistema de STR empleado. Los *kits* comerciales son desarrollados para permitir la amplificación de muchos loci STR simultáneamente. El análisis de estos productos de amplificación, puede ser hecho en una o dos corridas electroforéticas dependiendo del kit usado.

Hoy en día, la comunidad forense en la tipificación de ADN tiene estandarizado el uso de los marcadores de los STR. En Noviembre de 1997, el FBI (Federal Bureau of Investigation) seleccionó 13 marcadores STR para servir como centro del CODIS (Combined DNA Index System): CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11 (29).

Interpretación del perfil genético

A mediados de los años 90's, la tecnología dio un cambio abarcando el uso de la PCR de loci STR. La Reacción en Cadena de la Polimerasa, ha sido relacionada con una fotocopiadora molecular, posibilita la amplificación exponencial de cantidades muy pequeñas de ADN. Cuando se utilizaban los métodos más antiguos, se requería de al menos 500 ng de ADN para obtener exitosamente un perfil genético. Con PCR, 1 ng o menos del material puede ser analizado. Los perfiles basados en PCR de STR, son muy sensibles requieren de cantidad de ADN problema, que oscila en el orden de 0.5 a 1.0 ng.

La introducción del análisis de los STR basados en la PCR, ha sido la más grande innovación que ha implementado la confiabilidad en el uso del perfil genético.

La tecnología de secuenciación fluorescente automatizada permite detectar varios y diferentes fragmentos. Para la determinación de fragmentos de ADN por tamaño, es necesario el uso de dos tipos de marcadores estándar. En todas las muestras que se someterán a electroforesis hay una serie de fragmentos de ADN etiquetados fluorescentemente de tamaño conocido. Este estándar de tamaño interno, puede estar compuesto por ADN bacteriófago restringido etiquetado o, alternativamente, ADN artificial.

La segunda clase de marcador estándar es el "*allelic ladder*" o marcador alélico, está compuesto de los alelos más comunes de cada locus, es comparado con cada una de las bandas de una corrida de electroforesis. El *allelic ladder* muestra todo un rango de alelos comunes de un locus. Sin embargo, no es necesario que todos los alelos estén representados en él. Si la muestra presenta muchos alelos raros, algunos de estos pueden estar fuera de los rangos del ladder. Los rangos alélicos de algunos loci pueden superponerse. Estos loci son etiquetados con diferentes colorantes, lo que permite que cada locus sea identificado. Los loci que son etiquetados con el mismo color tienen que estar separados lo suficientemente para minimizar la posibilidad de que se superpongan entre ellos.

El tamaño de los alelos es comparado con referencia al estándar interno. El tamaño de alelos desconocidos en una muestra en cuestión, se compara con el de los alelos conocidos del "*allelic ladder*" o marcador alélico. Las unidades de los fragmentos son de pares de bases (bp). Si se dispone de un alelo que se encuentre con una diferencia de 0.5 bp del pico del marcador alélico correspondiente, es posible realizar el análisis del alelo utilizando el estándar de tamaño interno. En todos los sistemas electroforéticos, puede haber una pequeña cantidad de migración aberrante, debido a que esta puede ocurrir más lentamente o más rápidamente de lo esperado, este evento se denomina cambio de banda, que tiende a estar en la misma dirección para dos alelos en el mismo carril, que puede ser medido a fin de asegurar la coherencia en el resultado, actuando así como un control de calidad adicional y también como un medio para designar *Off-ladder*, o alelos "raros".

Al interpretar los electroferogramas es posible que algunas anomalías genéticas del sujeto analizado y errores de procedimiento o en la aplicación de la técnica y los artificios de la PCR produzcan resultados erróneos en el perfil genético. Por ejemplo en:

- ❖ Anomalías genéticas
 - Trisomías y duplicación de genes
 - Mutación somática
- ❖ Artificios de la PCR
 - Equilibrio heterocigótico
 - Pérdida de alelos (*Allelic Dropout*)
 - Resbalón de la Polimerasa (*Stuttering*)
- ❖ Artificios no específicos
 - Degradación del ADN
- ❖ Traslape de fluorescencias (*Pull-Up*)
- ❖ Técnica pobre de operación
- ❖ Supresión de la eficiencia de la amplificación, alelos silenciosos o nulos (30,31,36).

Sistema Óseo

El conjunto estructural integrado por los huesos y cartílagos se denomina sistema esquelético. El esqueleto humano es el conjunto total y organizado de piezas óseas que proporciona al cuerpo humano una firme estructura multifuncional. El sistema esquelético tiene varias funciones, las más destacadas son:

- Sostén mecánico del cuerpo y de sus partes blandas, que actúa como armazón que mantiene la morfología corporal.

- Mantenimiento postural: permite posturas como la bipedestación.
- Soporte dinámico: colabora para la marcha, locomoción y movimientos corporales.
- Contención y protección de vísceras, ante cualquier presión o golpe del exterior.
- Almacén metabólico: funcionando como moderador de la concentración e intercambio de sales de calcio y fosfatos.

Estructura de los huesos

Al revisar la estructura de uno de los huesos largos, es posible comprender la de los restantes. Este se identifica fácilmente porque su longitud es mayor que su anchura. Sus partes características son las siguientes (Figura 3):

- La diáfisis, es el cuerpo o porción cilíndrica principal del hueso.
- Las epífisis, son los extremos proximal y distal del hueso.
- Las metáfisis, son las regiones de los huesos maduros donde las diáfisis se une con la epífisis. Durante el crecimiento de los huesos, las metáfisis comprenden la placa epifisaria, que es el sitio donde el cartilago es remplazado por tejido óseo. Dicha placa se forma por tejido hialino, que permite que la diáfisis aumente en longitud, pero no en anchura.
- El cartílago articular, constituye una capa delgada de cartilago hialino, que cubre la parte de la epífisis donde un hueso se articula con otro. Este cartílago, reduce la fricción y absorbe los impactos que sufren las articulaciones debido a los movimientos libres.
- El periostio, es una vaina resistente de tejido conectivo denso e irregular, que rodea la superficie ósea que no está cubierta por el cartilago articular. Esta capa contiene las células formadoras de tejido óseo, gracias a las cuales el hueso aumenta su diámetro a grosor, pero no su longitud, protege al hueso, participa en la reparación de fracturas, la nutrición ósea y sirve como punto de inserción para tendones y ligamentos.
- La cavidad medular corresponde al espacio interno de la diáfisis que contiene la médula ósea amarilla grasa.
- El endostio es una membrana que contiene células formadoras de hueso y recubre la cavidad medular.

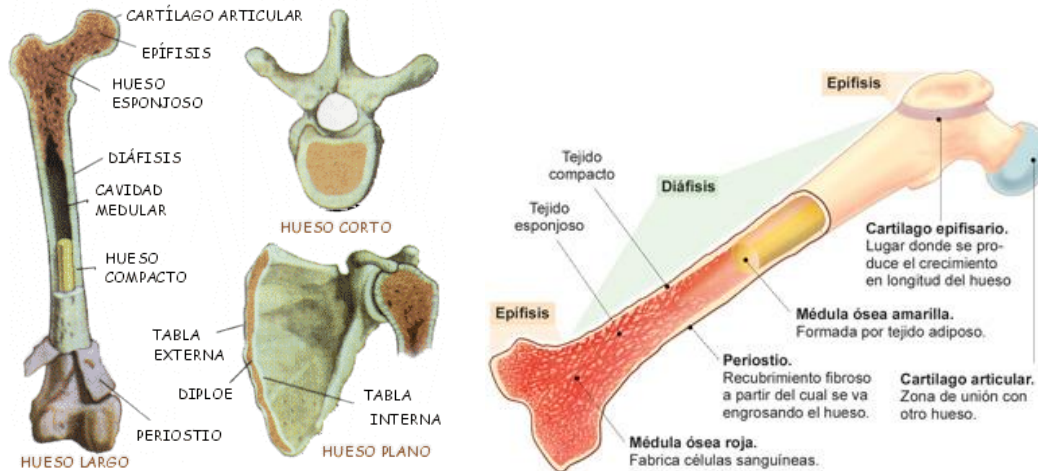


Figura 3. Estructura de un hueso largo, uno corto y uno plano. (Tomado de www.juntadeandalucia.es, consultado Junio de 2009)

Histología del hueso

El tejido óseo contiene una abundante matriz extracelular de materiales que rodean células, de manera que están muy separadas entre sí. En el hueso, la matriz se compone de 25% de agua, 25% de fibras proteínicas y 50% de sales minerales cristalizadas. Hay cuatro tipos de células en el tejido óseo: osteógenas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Figura 4).

- Las células osteógenas son células madre no especializadas que se derivan del mesénquima, el sitio donde se forman todos los tejidos de tipo conectivo. Son las únicas células óseas con capacidad de división. Las células hijas resultantes se transforman en osteoblastos. Las osteógenas se localizan en la porción interna del periostio, en el endostio y en los conductos internos de los huesos que contienen vasos sanguíneos.
- Los osteoblastos son las células que construyen el hueso. Sintetizan y secretan fibras de colágena y otros componentes orgánicos necesarios para formar la matriz del tejido óseo, además de iniciar el proceso de calcificación.
- Los osteocitos son células óseas maduras que constituyen el tipo celular principal del tejido óseo. Se derivan de los osteoblastos que quedan atrapados en las secreciones de la matriz. Sin embargo, ya no secretan materiales de ésta. En vez de ello, mantienen las actividades celulares diarias del tejido óseo, como el intercambio de nutrientes y desechos con la sangre.
- Los osteoclastos son células muy grandes, derivadas de la fusión de hasta 50 monocitos (un tipo de glóbulo blanco) y se concentran en el endostio. En el lado de estas células que da hacia la superficie del hueso,

la membrana plasmática del osteoclasto tiene pliegues profundos, que se denominan bordes arrugados. En ellos, la célula libera tanto enzimas lisosómicas potentes como ácidos que digieren los componentes proteínicos y los minerales del hueso subyacente. Esta destrucción de la matriz ósea es parte del desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso.

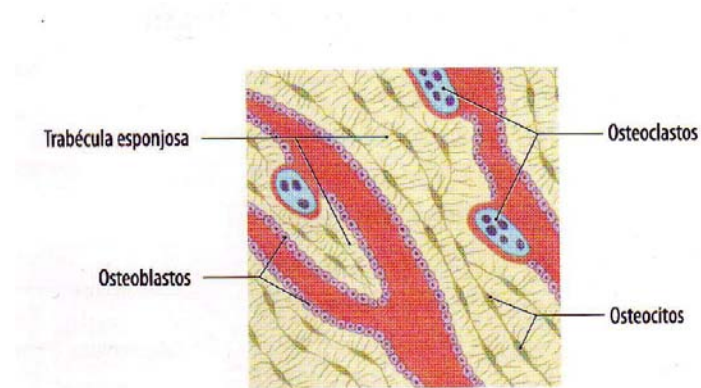


Figura 4. Esquemización de las diferentes células que componen el tejido óseo. (Tomado de www.fisiologiaviva.blogspot.com, consultado Agosto de 2009)

A diferencia de otros tejidos conectivos, la matriz ósea contiene abundantes sales minerales inorgánicas, principalmente hidroxapatita (fosfato de calcio) pequeñas cantidades de carbonato de calcio, de hidróxido de magnesio, fluoruro de calcio, fosfato de magnesio y cloruro de sodio. Cuando estas sales son depositadas en la estructura, que forman las fibras de colágena de la matriz, se cristalizan y el tejido se endurece. Los osteoblastos producen el proceso de calcificación o mineralización.

La dureza de un hueso depende de las sales minerales inorgánicas cristalizadas que contiene; en tanto que su flexibilidad, depende de las fibras de colágena, que además, junto con otras moléculas, le confieren resistencia a la tensión, que se opone al estiramiento y a la ruptura.

Las sales minerales empiezan a cristalizarse en los espacios microscópicos que hay entre dichas fibras, y una vez que se llenan, se acumulan alrededor de las fibras de colágena. La combinación de ambos le confiere a los huesos su dureza característica. Los huesos no son completamente sólidos, tienen muchos espacios diminutos entre sus componentes duros, algunos de estos, son conductos para vasos sanguíneos que aportan nutrientes a las células óseas, en tanto que otros son áreas de almacenamiento para la médula ósea roja. De conformidad con el tamaño y la distribución de los espacios, las regiones de un hueso se clasifican en

compactas y esponjosas. En general, el hueso compacto constituye 80% del esqueleto, y el esponjoso, el 20% restante.

Tejido óseo compacto

Posee contados espacios entre sus componentes duros. Forma la capa externa de todos los huesos largos. Brinda protección y sostén, además de resistir los esfuerzos que producen con el apoyo de peso y los movimientos.

El hueso compacto está dispuesto en unidades llamadas osteonas o sistema de Havers (Figura 5). Los vasos sanguíneos y linfáticos, así como los nervios, provenientes del periostio penetran el hueso compacto por los conductos perforantes (de Volkmann). Los vasos y nervios de estos conductos se conectan con los de la cavidad medular, el periostio y los conductos centrales (de Havers), que tienen un trayecto longitudinal en los huesos y se hayan rodeados por laminillas concéntricas (de Havers), que son anillos de matriz calcificada dura. Entre éstas, hay pequeños espacios llamados lagunas que contienen osteocitos. Desde las lagunas, se irradian en todas direcciones diminutos canalículos llenos de líquido extracelular. En el interior de estos últimos, se encuentran las delgadas prolongaciones digitiformes de los osteocitos. Los canalículos comunican las lagunas entre sí y con los conductos centrales. Este intrincado sistema de ramificación permite contar con muchas rutas para que el oxígeno y los nutrientes de la sangre se difundan a través del líquido extracelular hacia los osteocitos y para que los desechos sean expulsados por los vasos sanguíneos.

Las osteonas del tejido óseo compacto, se ubican en la misma dirección que las líneas de esfuerzo, por ejemplo, en la diáfisis son paralelas al eje longitudinal del hueso. El tejido óseo compacto tiende a ser más grueso en las regiones de los huesos donde se aplican los esfuerzos en pocas direcciones. Las líneas de esfuerzo en los huesos no son estáticas, cambian en el momento de aprender a caminar y en respuesta a la repetición d actividades físicas intensas, como cuando un sujeto se entrena para el levantamiento de pesas. Además, pueden variar como resultado de fracturas o deformidades físicas. De este modo, la organización de las osteonas sufre modificaciones con el paso del tiempo en respuesta a las exigencias físicas a que se ve sometido el esqueleto.

Las áreas que hay entre las osteonas contienen laminillas intersticiales, que también incluyen osteocitos y canalículos. Dichas laminillas son fragmentos de osteonas antiguas que sufrieron destrucción parcial durante el crecimiento o remodelación óseos. Las que rodean el hueso justo debajo del periostio, se

denominan laminillas circunferenciales externas, en tanto que las laminillas circunferenciales internas son las que envuelven la cavidad medular.

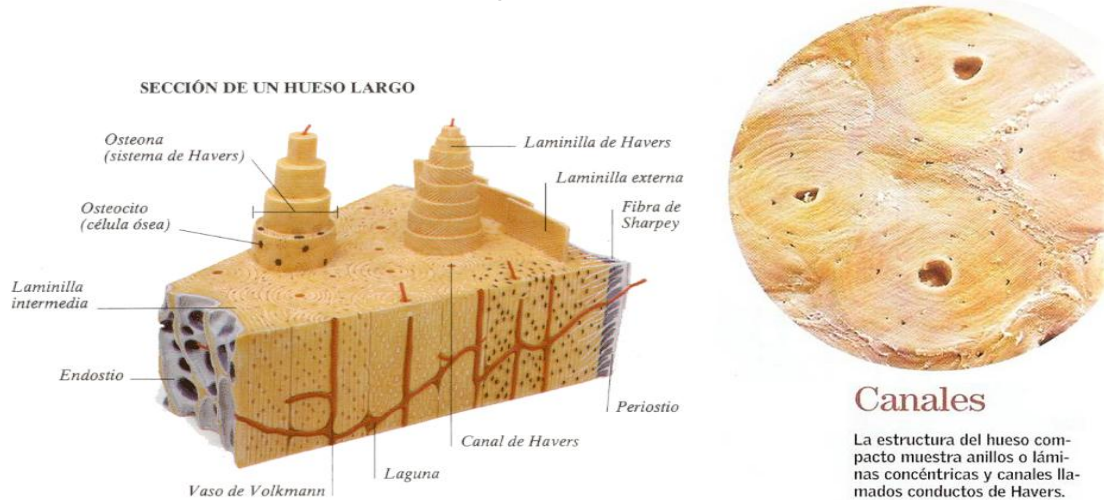


Figura 5. Imagen de la estructura interna de un hueso compacto. (Modificado de www.fiunam4.files.wordpress.com, consultado Junio de 2009)

Tejido óseo esponjoso

El tejido óseo esponjoso no contiene osteonas verdaderas, sino que consta de laminillas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas de hueso, llamadas trabéculas. Los espacios macroscópicos que existen entre las pertenecientes a algunos huesos están llenos de médula ósea roja, que es la encargada de producir células sanguíneas. Dentro de cada trabécula hay osteocitos situados en lagunas a partir de las cuales se irradian los canalículos. Los osteocitos trabeculares reciben directamente nutrimentos de la sangre que circula por las cavidades medulares (Figura 4).

El tejido óseo esponjoso constituye la mayoría de los huesos (tanto los cortos, como los planos y los de forma irregular), casi todas las epífisis de huesos largos y una franja angosta alrededor de la cavidad medular de la diáfisis de huesos largos.

A primera vista, la estructura de las osteonas del tejido óseo compacto parece muy organizada, mientras que las trabéculas del hueso esponjoso dan la impresión de tener una organización menor. Sin embargo, estas últimas se orientan de manera precisa a lo largo de las líneas de esfuerzo, una característica que les permite a los huesos, resistir esfuerzos y transferir fuerzas sin romperse. El tejido esponjoso se localiza principalmente en los sitios donde los huesos no están sometidos a esfuerzo muy intenso, o donde éste se aplica desde muchos puntos situados en distintas direcciones.

El tejido óseo esponjoso difiere del compacto en dos aspectos: en primer término, es ligero, reduce el peso global de los huesos, que pueden moverse más fácilmente cuando un músculo ejerce tracción sobre ellos. En segundo lugar, las trabéculas sirven de receptáculo y protección a la médula ósea roja. En adultos, el tejido óseo esponjoso de los huesos de la cadera, las costillas, el esternón, la columna vertebral y los extremos de los huesos largos, es el único lugar donde hay médula ósea roja y por tanto hematopoyesis.

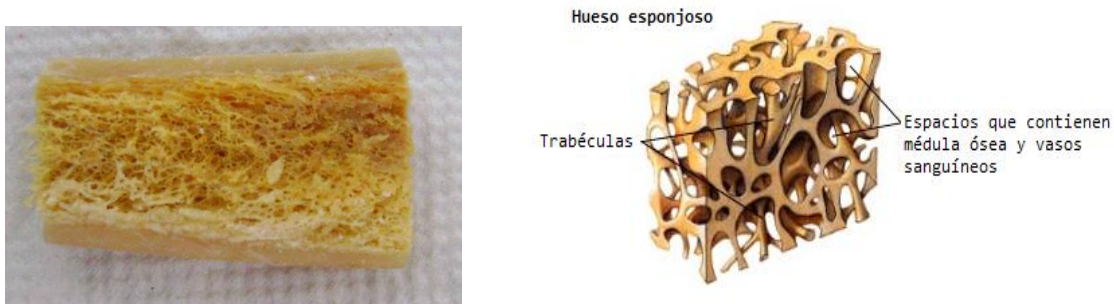


Figura 6. Imagen de la estructura interna de un hueso esponjoso. (Modificado de www.anatomiahumana.ucv.cl, consultado Agosto de 2009)

Cartílago

El cartílago está formado por una red densa de fibras de colágena y elásticas incrustadas firmemente en sulfato de condroitina, un componente flexible que es la sustancia fundamental. El cartílago resiste esfuerzo mucho mayores que los tejidos conectivos denso y laxo que se debe a las fibras de colágena, y a su elasticidad (capacidad para recuperar su forma original luego de la deformación), y al sulfato de condroitina.

Las células del cartílago maduro, los condrocitos, se hallan solos o en grupos dentro de espacios de la matriz llamados lagunas. En su mayor parte, a la superficie del cartílago la rodea una membrana de tejido conectivo denso e irregular, el pericondrio. A diferencia de otros tejidos conectivos, el cartílago no posee vasos sanguíneos ni nervios, excepto en el pericondrio. Hay tres tipos de cartílago: hialino, fibrocartílago y elástico.

- Cartílago hialino. La sustancia fundamental de este cartílago es un gel resistente que se halla en el organismo, es brillante de color blanco azulado. Las fibras de colágena finas son inapreciables con las técnicas de coloración ordinarias, mientras que en las lagunas se observan condrocitos prominentes. El pericondrio rodea gran parte del cartílago hialino, a excepción del cartílago de las articulaciones y cuando el ser humano está en la etapa de crecimiento, las placas epifisarias. El cartílago hialino es el más abundante del cuerpo. Brinda flexibilidad y

sostén, además de reducir la fricción y absorber impactos en las articulaciones. Es el más débil de los tres tipos de cartílago. Localización: extremos de huesos largos, extremo anterior de las costillas, nariz, partes de la laringe, traquea, bronquios, y esqueleto embrionario.

- **Fibrocartílago.** Los condrocitos están dispersos entre haces claramente visibles de fibras de colágena en la matriz de este tipo de cartílago. El fibrocartílago carece de pericondrio. Este tejido combina la resistencia con la rigidez y es el más resistente de los tres tipos de cartílago. Se localiza en: sínfisis del pubis (donde se une el hueso coxal por delante), discos intervertebrales, meniscos (acojinamiento cartilaginoso) de la rodilla y porciones de los tendones que se insertan en el cartílago.
- **Cartílago elástico.** En este tejido, los condrocitos se localizan en una red de fibras elásticas de la matriz. Posee pericondrio. Está provisto de resistencia y elasticidad. Conserva la forma de ciertas estructuras, como el oído externo. Localización: epiglotis, pabellón de la oreja y trompas de Eustaquio (32).

Planteamiento del Problema

En el ámbito forense se cuenta con diversas técnicas con las que es relativamente fácil y rápido extraer ADN de diversos tipos de muestras como sangre, pelos, tejidos blandos, saliva y otros fluidos corporales. Sin embargo, el sustrato más difícil de trabajar son los restos óseos debido a la composición mineral de su matriz, ya que ésta interfiere en la lisis celular que permite liberar el ADN. Adicionalmente, el tejido óseo en la gran mayoría de los casos se encuentra a merced de factores ambientales extremos, que ocasiona la degradación del material genético, que deriva en la obtención de bajas cantidades de ADN amplificable.

Por lo anterior, en este estudio se llevará a cabo la comparación del rendimiento de ADN obtenido por dos métodos de extracción, uno en fase sólida con el kit DNA IQ System[®] y otro en fase líquida con el kit SV Total RNA Isolation System[®] (modificado) que incluyen técnicas más rápidas y que dan como resultado la obtención de ADN libre de inhibidores y con la calidad requerida para la amplificación con múltiples STR's.

Objetivos

- Evaluar el rendimiento de ADN extraído a partir de tejido óseo con los métodos DNA IQ System[®] y SV Total RNA Isolation System[®] modificado.
- Determinar si el extracto se encuentra libre de inhibidores de la PCR.
- Determinar si la desproteinización posterior a la digestión de la muestra, influye en el rendimiento del ADN obtenido al aplicar los métodos de extracción en fase sólida (DNA IQ System[®]) y líquida (SV Total RNA Isolation System[®]-modificado)

Hipótesis

- Se obtendrá un mayor rendimiento de ADN con el método en fase líquida (*SV Total RNA Isolation System*[®] modificado) en comparación con el rendimiento de ADN en fase sólida (*DNA IQ System*[®]), basándose en el principio de que las membranas SV[®] atrapan todos los ácidos nucleicos que pasen a través de ellas mientras que las perlas paramagnéticas del *DNA IQ System*[®] están diseñadas para atrapar solo una cantidad determinada de ADN.
- Entre los mismos métodos, se obtendrá un mayor rendimiento, si se aplica una desproteización posterior a la digestión, basándose en el fundamento de que la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico desnatura proteínas y separa los ácidos nucleicos de los detritos celulares.

Diseño de investigación

Tipo de estudio

- Experimental
- Prospectivo
- Transversal
- Comparativo

Población de estudio

Diez restos óseos humanos provenientes de diferentes personas.

Criterios

Inclusión:

Todos los restos óseos humanos recibidos para estudio de identificación, con preferencia escogiéndose aquellos que tengan tejido óseo compacto.

Exclusión:

Se excluyen aquellos restos no humanos.

Eliminación:

Se eliminan del estudio todos aquellos restos que se observen severamente dañados por el calor (calcinados).

Variables dependientes

- Cantidad y calidad de ADN extraído por cada método aplicado.

Variables independientes

- Método de extracción utilizado.
- Cantidad de hueso molido utilizado.

Material y Métodos

Material

- Cepillo
- Fibra de metal
- Toallas de papel
- Gradillas
- Tubos Falcon[®] de 15 mL, estériles
- Bandeja de plástico
- Espátula
- Pinzas
- Tubos Eppendorf[®] de 1.5 mL estériles
- Tubos Eppendorf[®] de 0.5 mL estériles
- Placas de 96-Pozos
- Spin basket[®]
- Gradilla magnética
- Pipetas Pasteur desechables estériles
- Tanque para Nitrógeno
- Guantes de látex estériles y libres de polvo
- Guantes criogénicos

Reactivos

- Agua destilada
- Agua libre de nucleasas (Promega[®])
- Nitrógeno líquido
- Alcohol etílico absoluto
- Proteinasa K 18 mg/mL (Promega[®])
- DTT (Dithiotreitol) 1M (Promega[®])
- Bone Incubation Buffer[®] (Promega[®])
- Kit DNA IQ[®] (Promega[®])
- Kit SV Total RNA SV Isolation System[®] (Promega[®])
- Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico (25:24:1)
- Kit Plexor HY System[®] (Promega[®])
- Go Taq Hot Start Polimerasa 5 u/ μ L[®] (Promega[®])
- Kit Power Plex 16 System[®] (Promega[®])
- Kit Power Plex Y System[®] (Promega[®])
- DNA-OFF Solución[®]
- Hipoclorito de sodio al 10% y 3%

Instrumentos

- Termómetro
- Microcentrífuga para tubos Eppendorf®
- Centrifuga para tubos Falcon®
- Baño seco
- Thermo-mixer
- Vortex
- Moto-A Truper®
- Micropipeta Eppendorf® 10 µL
- Micropipeta Eppendorf® 20 µL
- Micropipeta Eppendorf® 200 µL
- Micropipeta Eppendorf® 1000 µL

Equipos

- Freezer/Mill 6750 SPEX SamplePrep®
- 7500 Real-Time PCR System®
- Termociclador Applied Biosystems 9700®
- ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer®

Método

I. Limpieza de los restos óseos

- Se le asignó un número de registro a cada muestra.
- Se anotaron características físicas de la muestra.
- Se retiró con un cepillo, todo el material orgánico no deseado del hueso, si poseía tejido putrefacto, se procedió a retirar con un bisturí.
- Se colocó en una bandeja grande con agua destilada.
- Se talló el hueso con ayuda de una fibra metálica hasta retirar cualquier resto de tejido o tierra, y se enjuagó con agua destilada, tantas veces como fue necesario, de acuerdo a que tan sucia se encontraba la muestra.
- Se colocó en disolución de hipoclorito de sodio al 3% por 15 minutos y enjuagó con abundante agua destilada (33).
- Se dejó secar toda la noche previa al análisis, sobre papel absorbente limpio.

II. Pulverizado de la muestra ósea

- Se sumergió el resto óseo previamente lavado, en Nitrógeno líquido (NL) por dos minutos.
- Se hicieron cortes al hueso utilizando el *Moto-A Truper*[®], procurando enfriar el hueso en NL cada 40 segundos. Las dimensiones de los fragmentos fueron de aproximadamente: 0.5 cm x 0.5 cm.
- Se limpió con un hisopo seco estéril (control negativo) el interior del vial del *Freezer Mill 6750*[®] antes de depositar la muestra de hueso.
- Se colocó el impactor (barra metálica) dentro del vial y se llenó con no más de dos terceras partes, con los fragmentos de hueso, y se tapó.
- Se sacudió el vial para verificar que el impactor se movía con facilidad de un lado a otro dentro del recipiente (34).
- Se colocó el vial dentro del *Freezer Mill 6750*[®].
- Se llenó con NL hasta la marca el *Freezer Mill 6750*[®], utilizando para ello los guantes criogénicos.
- El *Freezer Mill 6750*[®] se cerró lentamente para evitar que el NL salpicara.
- Se programó de la siguiente manera: T1 (pulverizado) = 3 min, T2. (enfriamiento) = 2 min, T3 (pre-enfriamiento) = 5 min, Rate = 10, Ciclos = 3.
- Después de que terminaron los ciclos, se sacó el vial y dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min.
- Se colocó el hueso pulverizado en un tubo Falcon[®] de 15 mL.
- Se limpió el equipo con toallas de papel absorbente.

III. Digestión de la muestra

- Se pesaron 4 g de polvo de hueso en un tubo Falcon[®] de 15 mL.
- Se prepararon 6 mL del buffer de digestión colocando por cada mililitro 800 μ L de Bone Incubation Buffer[®], 100 μ L de Proteinasa K (18 mg/mL) y 100 μ L de DTT 1M.
- Se adicionó el buffer de digestión a la muestra.
- Se agitó perfectamente para homogenizar la mezcla.
- Se incubó toda la noche a 56°C y con agitación.
- Se dividió el producto digerido en dos porciones iguales y se colocaron en tubos Falcon de 15 mL.

IV. Extracción de ADN con desnaturalización de proteínas

- Se adicionó a una de las porciones del digerido 4 mL de la mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1).
- Se agitó en vortex durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos.
- Se separó la fase acuosa y se colocó en dos tubos, en proporciones iguales.
- Se desechó el tubo que contenía la fase orgánica y los detritos celulares.

V. Extracción de ADN sin desnaturalización de proteínas

- Uno de los tubos que contenía una porción del digerido original se centrifugó a 4000 rpm durante 7 minutos.
- Se separó el sobrenadante con cuidado de no perturbar el sedimento.
- Se colocó en dos tubos en proporciones iguales.
- Se desechó el tubo que contenía el sedimento.

VI. Purificación con *DNA IQ System*[®]

- Se tomó uno de los tubos de muestra con previa desnaturalización de proteínas y uno sin desnaturalización, y se procedió como se describió en el procedimiento anterior.
- Se adicionaron 200 μ L de buffer de lisis DNA IQ[®] (preparado con 1 μ L de DTT por cada 100 μ L de buffer).
- Se adicionaron 15 μ L de resina.
- Se agitó a alta velocidad por 3 segundos.
- Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.

- Se agitó por 3 segundos y se colocó en la gradilla magnética, la separación ocurre de manera instantánea.
- Se removió y descartó cuidadosamente la solución sin perturbar la resina.
- Se adicionaron 100 μ L de buffer de lisis DNA IQ[®] preparado.
- Se agitó por 3 segundos y se colocó en la gradilla magnética.
- Se removió y descartó cuidadosamente la solución sin perturbar la resina.
- Se adicionaron 100 μ L de Buffer de lavado DNA IQ[®] y se agitó por 3 segundos, se colocó en la gradilla magnética y se descartó cuidadosamente la solución sin perturbar la resina.
- Se repitió dos veces más el paso anterior.
- Con las tapas abiertas se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se colocaron 100 μ L de buffer de elución DNA IQ[®].
- Se agitó por 3 segundos.
- Se incubó a 65°C por 5 minutos.
- Se agitó y colocó en la gradilla magnética.
- Se removió cuidadosamente la solución sin perturbar la resina y se colocó en un tubo eppendorf[®] previamente etiquetado.
- Se desechó el tubo con la resina.
- Se conservó el eluido a -20°C.

VII. Purificación con *SV Total RNA Isolation System*[®] (Modificado)

- Se tomó uno de los tubos de muestra en las que previamente se realizó la desnaturalización de proteínas y uno sin desnaturalización. Y se procedió a la par, como a continuación se describe.
- Se adicionaron 2 volúmenes de etanol frío y se agitó por pipeteo.
- Se incubó a -20°C por 15 minutos.
- Se pasó el precipitado al ensamblaje de la columna del Kit SV Total RNA Isolation System[®].
- Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.
- Se desechó el contenido del tubo colector.
- Se adicionaron 800 μ L de Buffer de lavado RNA[®] al ensamblaje de la columna.
- Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.
- Se desechó el contenido del tubo colector.
- Se colocó el ensamblaje de la columna en el tubo de elución.
- Se adicionaron 100 μ L de agua libre de nucleasas verificando que cubriera toda la membrana.
- Se dejó reposar por 30 minutos.
- Se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 minutos.
- Se conservó el eluido a -20°C.

VIII. Cuantificación

- Se utilizó el *Kit Plexor HY System*[®] y *7500 Real-Time PCR System*[®].
- Se realizaron diluciones con el ADN estándar comenzando con 50 ng/ μ L hasta 0.0032 ng/ μ L, con un factor de dilución 5.
- Se preparó la mezcla de reacción de la siguiente manera para obtener un volumen final de 18 μ L por reacción:

Componente	Volumen por reacción
<i>Plexor HY 2X Master Mix</i> [®]	10 μ L
Agua grado amplificación	7 μ L
<i>Plexor HY 20X Primer/IPC Mix</i> [®]	1 μ L

- Se colocaron 18 μ L de la mezcla de reacción en cada uno de los pozos usados de la placa.
- Se colocaron 2 μ L de la muestra o de las diluciones del ADN estándar o del control negativo según era el caso a cada uno de los pozos. Se hizo esto por duplicado.
- Se selló la placa con la cubierta plástica ayudándose con el aplicador.
- En el equipo *7500 Real-Time PCR System*[®] se seleccionaron los fluoróforos utilizados en cada uno de los pozos de la placa preparada.
- Se programaron los ciclos térmicos de la siguiente manera (26):

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	2 min	1
95°C	5 s	38
60°C	35 s	
95°C	15 s	1
60°C	1 min	
95°C	15 s	

- Se guardaron los datos establecidos.
- Se colocó la placa en el equipo *7500 Real-Time PCR System*[®] y se presionó inmediatamente el botón "Iniciar".
- Al terminar se seleccionó el botón "Analizar" y después "Guardar".
- Se exportaron los datos de amplificación y los datos pertenecientes a la curva de fusión.
- Por último se analizaron los datos exportados con el *Plexor Análisis Software*[®].

IX. Amplificación

- Se utilizó el kit *Power Plex 16 System*[®].
- Se preparó para cada reacción la siguiente mezcla:

Componente	Volumen por reacción
<i>Gold ST★R 10X Buffer</i> [®]	2.5 µL
<i>PowerPlex 16 10X Primer Pair Mix</i> [®]	2.5 µL
<i>Go Taq Hot Start Polymerase a 5 u/µL</i> [®]	0.8 µL

- Tomando en cuenta los resultados de la cuantificación se adicionó el volumen de muestra necesario, en el que estaban contenidos 5 ng de ADN, a la mezcla antes mencionada.
- Se agregó agua libre de nucleasas cuanto bastara para 25 µL por reacción.
- Se amplificó con el siguiente ciclaje térmico utilizando el *Termociclador Applied Biosystems 9700*[®] (35,37):

Temperatura	Tiempo	Incremento de la temperatura (<i>Ramp</i>)	Ciclos
95°C	11 min	NA	1
96°C	1 min	NA	1
94°C	30 s	100%	10
60°C	30 s	29%	
70°C	45 s	23%	
90°C	30 s	100%	22
60°C	30 s	29%	
70°C	45 s	23%	
60°C	30 min	NA	1
4°C	Permanente	NA	

NA = No Aplica

X. Análisis de los resultados de amplificación por electroforesis capilar.

- Se utilizaron los reactivos para Post-Amplificación del Kit *Power Plex 16 System*[®].
- Se prepararon 24 µL de Formamida desionizada (grado alta pureza) con 0.3 µL del Estándar de Tamaño Interno (ILS) para cada muestra a correr.
- Se preparó el Marcador Alélico de la siguiente manera: 24 µL de Formamida desionizada (grado alta pureza), 0.3 µL del Estándar de Tamaño Interno (ILS) y 0.3 µL del Marcador Alélico (*Ladder*). Se preparó un Marcador Alélico por cada tres muestras a correr.
- Se corrieron las muestras y el marcador Alélico en el secuenciador *ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer*[®], utilizando los siguientes parámetros:

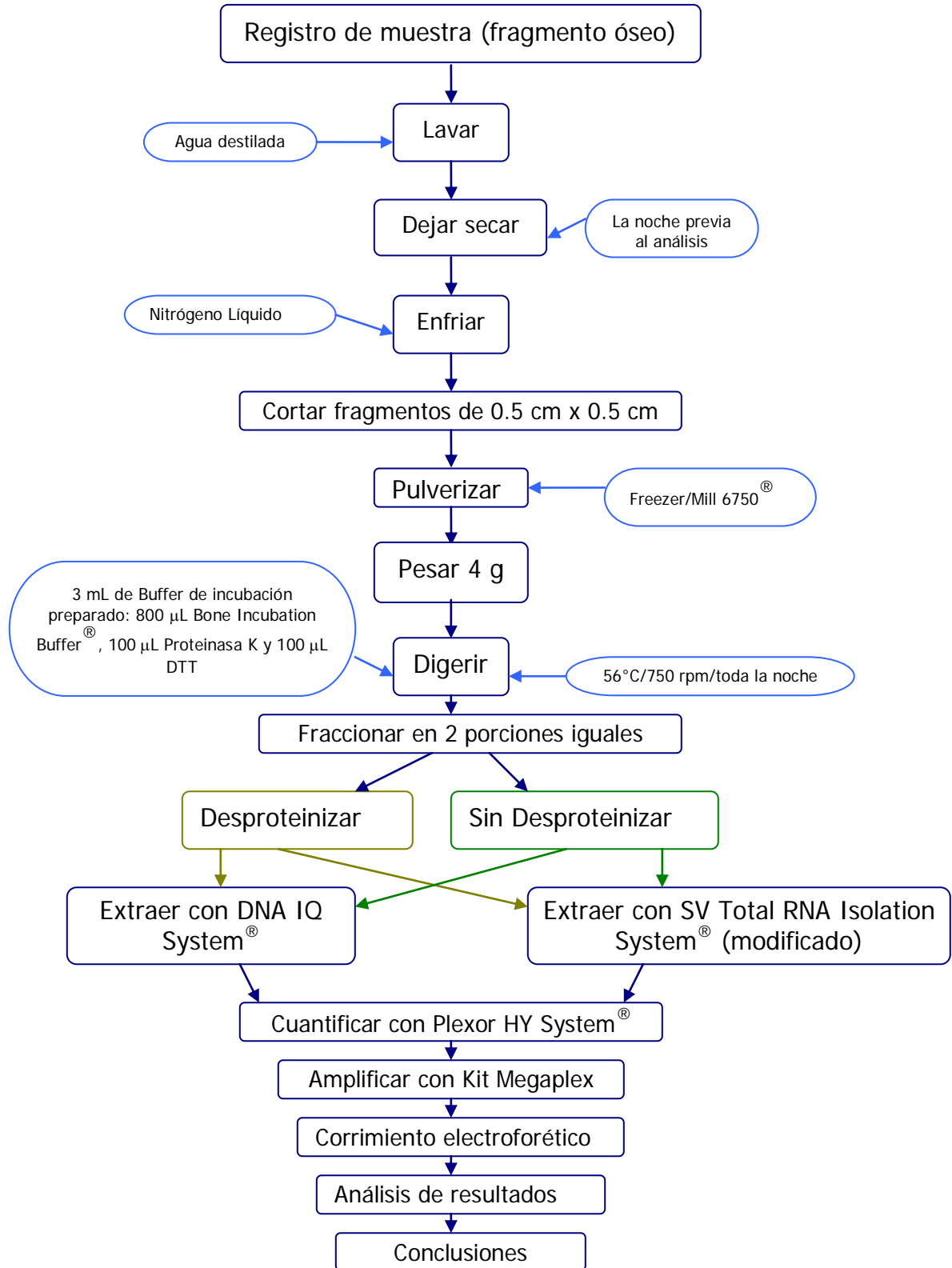
Parámetro	Especificación
Temperatura del horno (<i>Oven Temperatura</i>)	60°C
Voltaje del Pre-Corrimiento (<i>PreRun Voltage</i>)	15.0 KVolts
Tiempo del Pre-Corrimiento(<i>Pre-Run Time</i>)	180 segundos
Voltaje de Inyección (<i>Injection Voltage</i>)	3.0 KVolts
Tiempo de Inyección (<i>Injection Time</i>)	5 segundos
Voltaje del Número de pasos (<i>Voltage Number of Steps</i>)	10 nK
Intervalo del paso de Voltaje (<i>Voltage Step Interval</i>)	60 segundos
Tiempo de tardanza de los datos(<i>Data Delay Time</i>)	1 segundo
Voltaje de corrimiento (<i>Run Voltage</i>)	15.0 KVolts
Tiempo de corrimiento (<i>Run Time</i>)	1800 segundos

- Se analizaron los resultados con el software *GeneMapper ID v3.2*[®] para obtener el perfil genético de la muestra (38,39,42).

XI. Análisis estadístico.

- En este estudio, se propusieron dos métodos de extracción de ADN utilizando los kits comerciales *DNA IQ System*[®] (fase sólida) y el *SV Total RNA Isolation System*[®] modificado (fase líquida), para lo cual se utilizó como agente desnaturizante de proteínas la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para así determinar, con cual de los dos métodos se obtenía mayor rendimiento de producto amplificable, y si la desproteínización previa aumentaba el rendimiento de la extracción.
- Si las medias poblacionales son iguales, las medias muestrales serán parecidas, y existirán entre ellas diferencias atribuibles al azar, la variabilidad existente entre las medias de cada grupo será similar a las diferencias entre las puntuaciones individuales, de manera que F tomará un valor próximo a 1. En cambio, si las medias de las muestras son distintas, F tomará un valor mayor que 1. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F.
- Se usó Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores, para determinar las diferencias en cuanto al rendimiento de ADN obtenido en ng/μL entre los 4 métodos y las 10 muestras analizadas.
- Utilizando una hoja de cálculo se ordenaron los resultados por método, por muestras y por repetición.
- Se utilizó $\alpha = 0.05$ para el valor crítico de F.
- Se determinaron los valores obtenidos de F (valor crítico) para rechazar o aceptar la hipótesis de ANOVA de que las medias de distintas poblaciones coinciden y para saber si el resultado de la variable dependiente está influida por los métodos y el tipo de muestra estudiados.

Diagrama de Flujo de Método General







Resultados

Se utilizaron 10 restos óseos de diferentes personas fallecidas. Los elementos óseos analizados incluyen muestras de fémur, húmero, radio, costilla, vértebra y falanges.

Para la extracción de ADN se utilizaron 4 gramos de hueso pulverizado para cada una de las muestras por duplicado.

En la siguiente tabla se pueden observar las características iniciales de cada una de las muestras estudiadas.

No. De Muestra	Tipo de Muestra	Lugar de origen de la muestra	Imagen
1) 830	Fragmento de hueso fémur.	Encontrado entre pastizales. Estado de Morelos.	
2) 997	Fragmento de húmero derecho.	Proveniente de persona severamente quemada (avionazo). Estado de Sonora.	
3) 1031	Húmero	Estado de Morelos.	
4) 1039	Radio	Encontrado en el drenaje. Estado de Morelos.	

No. De Muestra	Tipo de Muestra	Lugar de origen de la muestra	Imagen
5) 1066	Costilla	Estado de Morelos.	
6) 1173	Vértebra	Exhumación. Estado de Sinaloa.	
7) 1216	Falanges	Exhumación. Estado de Colima.	
8) 1217	Falanges	Exhumación. Estado de Colima.	
9) 1232	Costilla	Cadáver encontrado a orilla de una carretera. Estado de Sonora.	
10) 1258	Fémur	Restos de persona severamente quemada. Estado de Coahuila.	

Los resultados obtenidos en cada una de las 10 muestras por los cuatro métodos empleados muestran un rendimiento de ADN significativamente más alto en el método *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado con desproteización, después disminuye el rendimiento en el mismo método pero sin desproteización, luego el método de *DNA IQ System*[®] con desproteización y por último el mismo método pero sin desproteización.

Para conocer la cantidad de ADN y la presencia de inhibidores se utilizó el kit *Plexor HY System*[®] (ver anexo A), con el cual se determinó con que muestras se podría obtener el perfil genético debido a la cantidad de ADN presente en las mismas. Así mismo, para descartar las muestras con las cuales no se obtendría un perfil genético debido a la presencia de inhibidores.

El perfil genético de cada una de las muestras se estableció utilizando la información obtenida de la cuantificación, para determinar el volumen requerido en el cual estuvieran contenidos 0.5 ng de ADN, cantidad necesaria para poder amplificar las regiones de interés. El kit utilizado para la amplificación fue el kit comercial *PowerPlex 16 System*[®]. Este kit contiene 16 marcadores de los cuales 13 son los establecidos para determinar el perfil genético y que son utilizados a nivel mundial por diversas instituciones como el FBI y la INTERPOL. Los marcadores genéticos que se determinaron son: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, FGA y la Amelogenina (ver Anexo B).

Los resultados para el rendimiento de ADN obtenido en cada uno de los métodos estudiados se presentan, en las siguientes tablas donde se puede observar el método utilizado, la cantidad de ADN en ng/ μ L obtenido, la presencia o ausencia de inhibidores en cada una de las repeticiones realizadas y si fue posible obtener el perfil genético en cada caso estudiado (ver Tablas 1-10).

También se presentan las gráficas en las que se compara la cantidad de ADN en ng/ μ L obtenida por método en cada una de las repeticiones realizadas para cada una de las muestras, en donde se puede observar la diferencia del rendimiento obtenido por cada uno de los métodos estudiados (ver Gráficas 1-10).

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 1 (Fémur)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0249	0.0131	No	No	Parcial
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.0	0.0	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0327	0.0168	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	2.06	2.11	No	Si	Completo

Grafica 1. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 1.

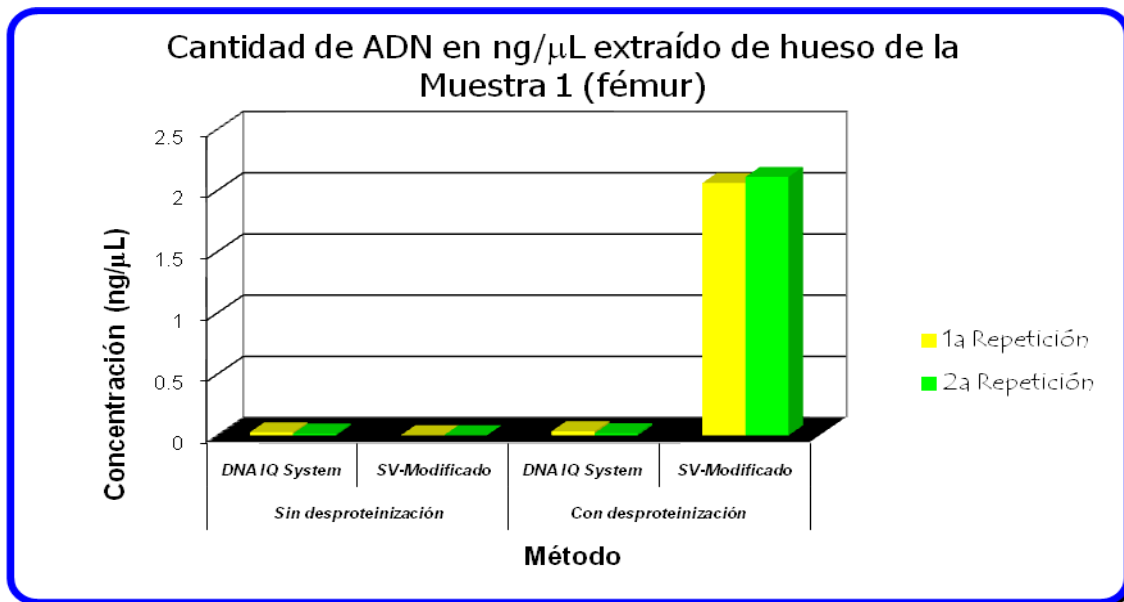


Tabla 2. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 2 (Húmero)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	8.68	2.05	No	No	Completo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	38.5	778	Si	Si	Completo
Con desproteínización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	10.8	6.85	No	Si	Completo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	731	1140	Si	Si	Completo

Grafica 2. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 2.

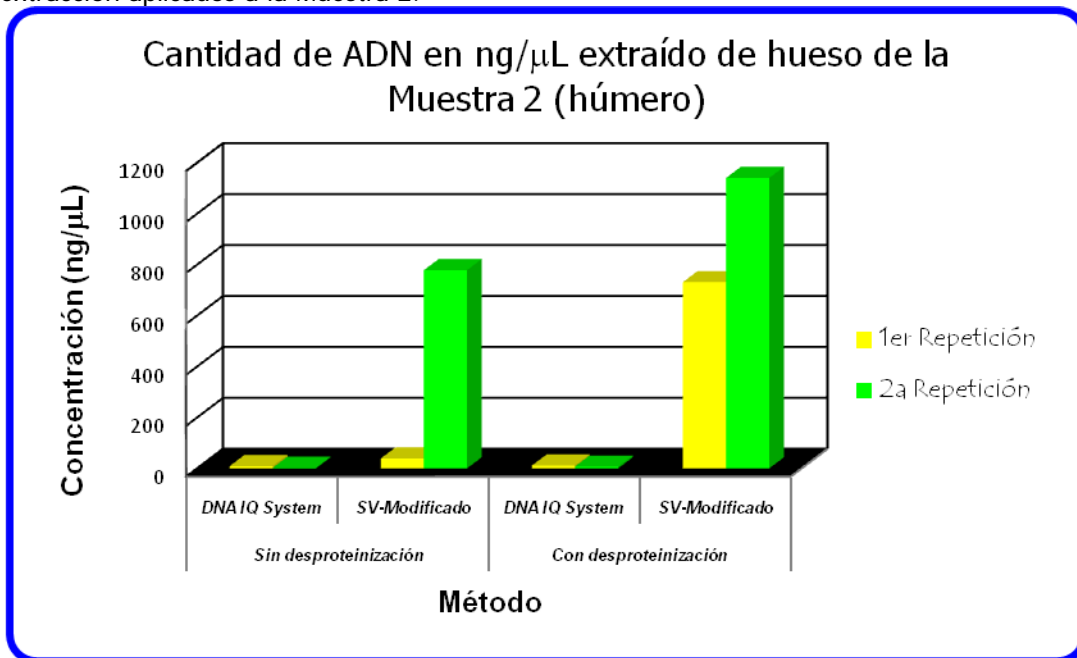


Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 3 (Húmero)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0665	0.0422	No	No	Completo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.684	0.745	No	No	Completo
Con desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0774	0.0447	No	No	Completo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	3.55	2.23	No	No	Completo

Grafica 3. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 3.

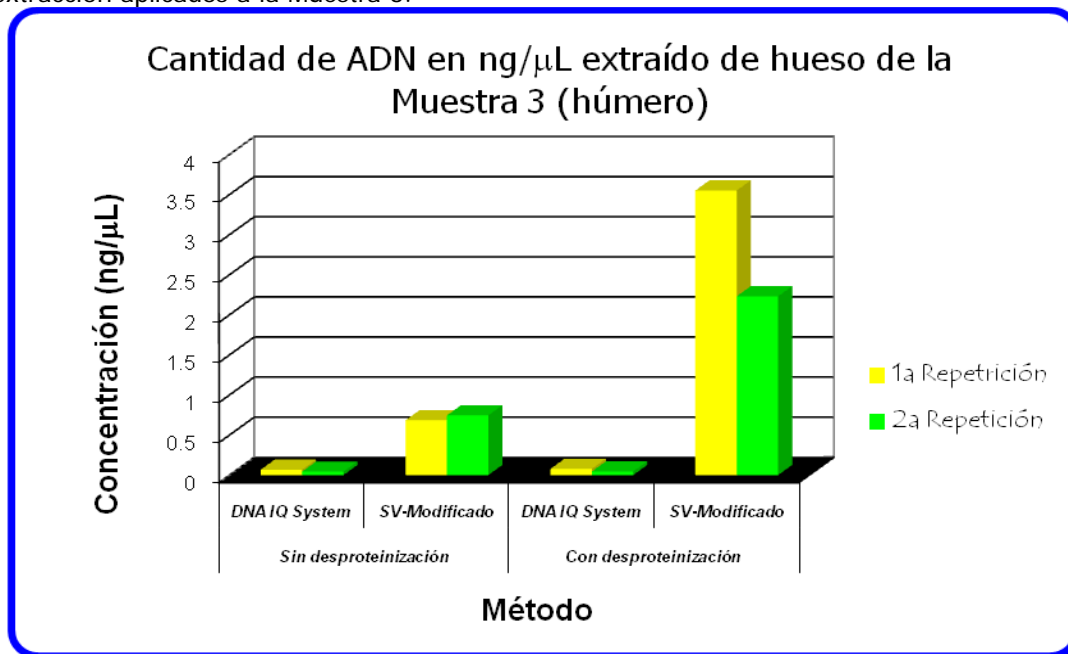


Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 4 (Radio)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteinización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.188	0.0	No	Si	Parcial
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	12.7	20.5	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteinización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0581	0.813	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	18.8	55.5	Si	No	Completo

Grafica 4. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 4.

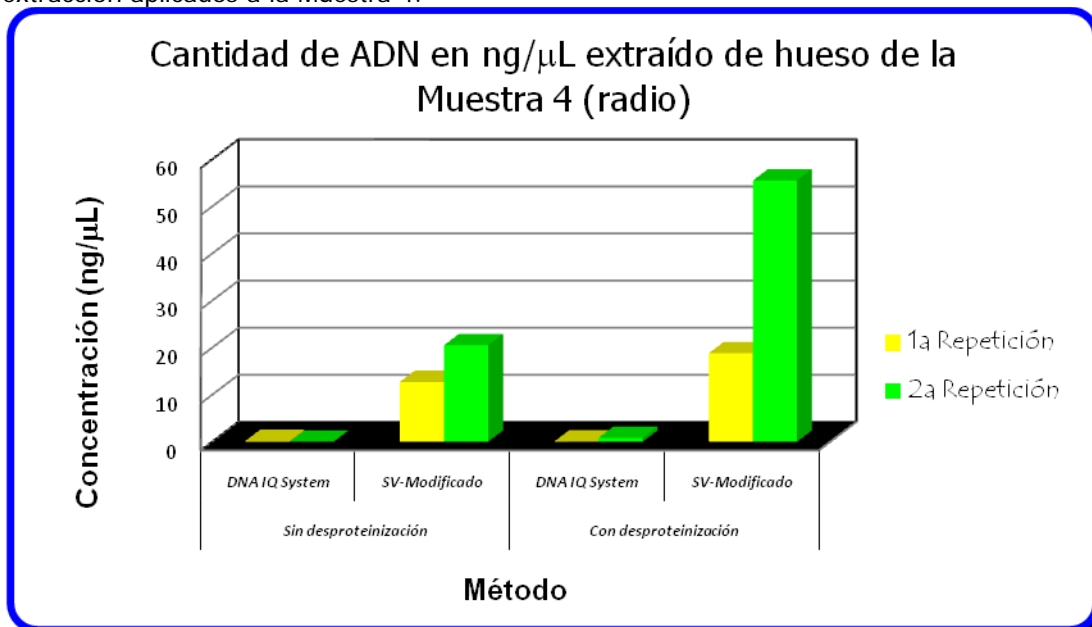


Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 5 (Costilla)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.00641	0.133	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.0	0.0	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0118	0.320	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	2.26	15.1	No	Si	Completo

Grafica 5. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 5.

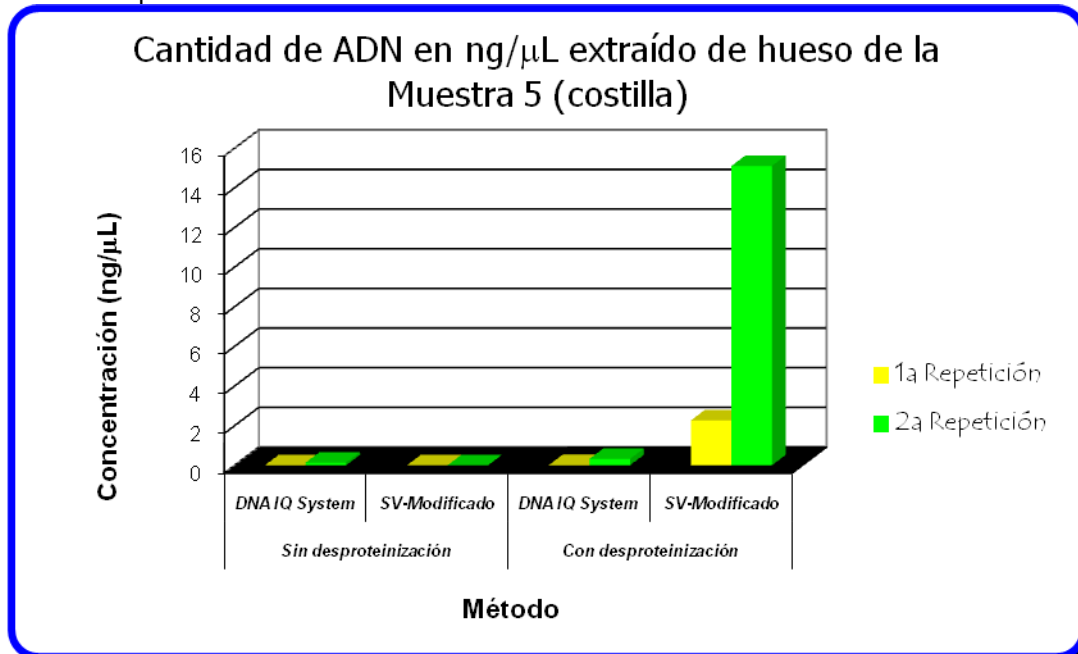


Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 6 (Vértebra)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/ μ L)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.00093	0.00161	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.0369	0.0241	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínización	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.00135	0.00152	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	1.58	1.94	No	No	Completo

Grafica 6. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 6.

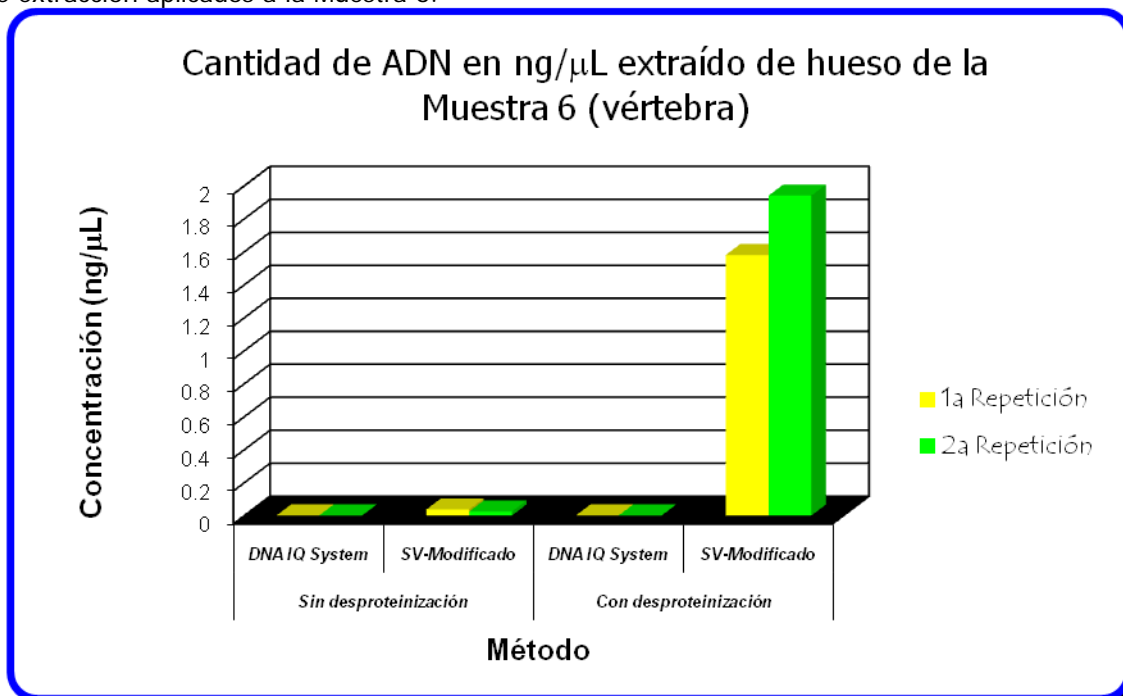


Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 7 (Falanges)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.00458	0.00555	Si	No	Completo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.0788	0.0148	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.328	0.0456	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.505	0.826	No	No	Completo

Grafica 7. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 7.

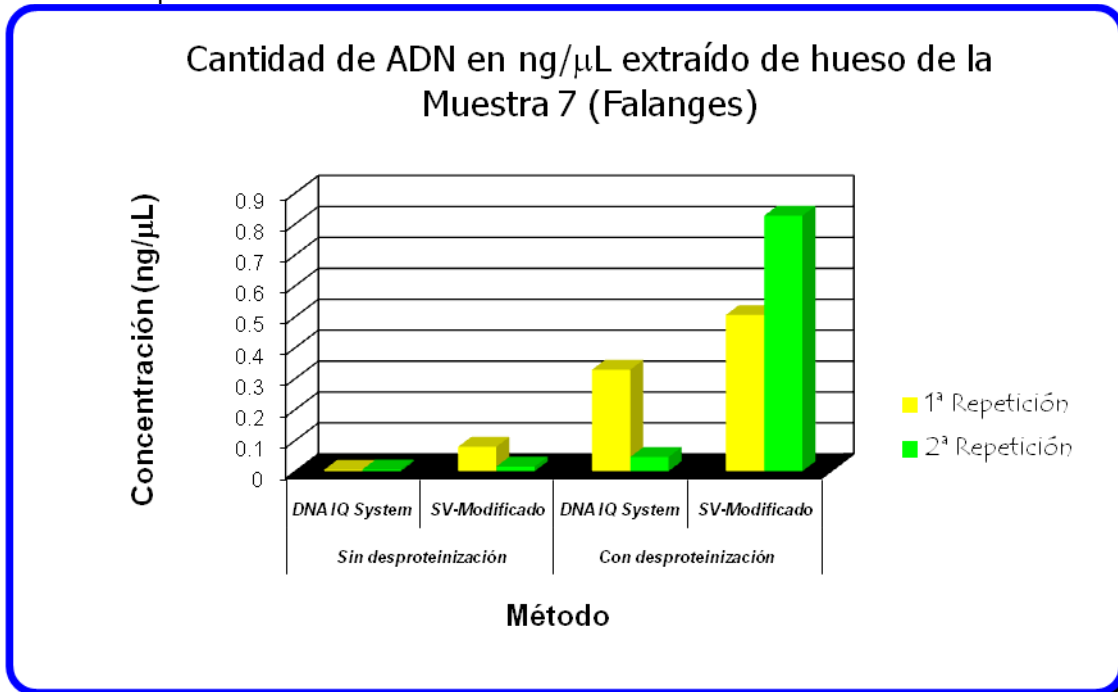


Tabla 8. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 8 (Falanges)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.00116	0.00508	Si	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.0	0.000834	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0575	0.00629	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.243	0.346	Si	Si	Completo

Grafica 8. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 8.

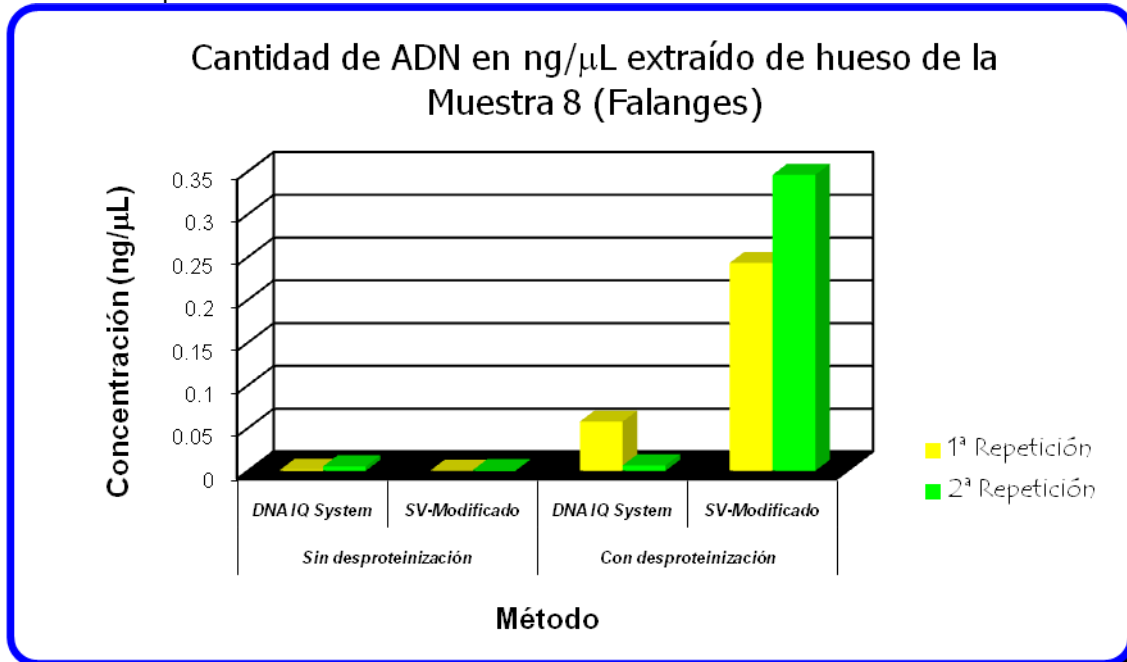


Tabla 9. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 9 (Costilla)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0152	0.0199	Si	Si	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.0952	0.286	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.0111	0.0136	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.480	0.595	No	No	Completo

Grafica 9. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 9.

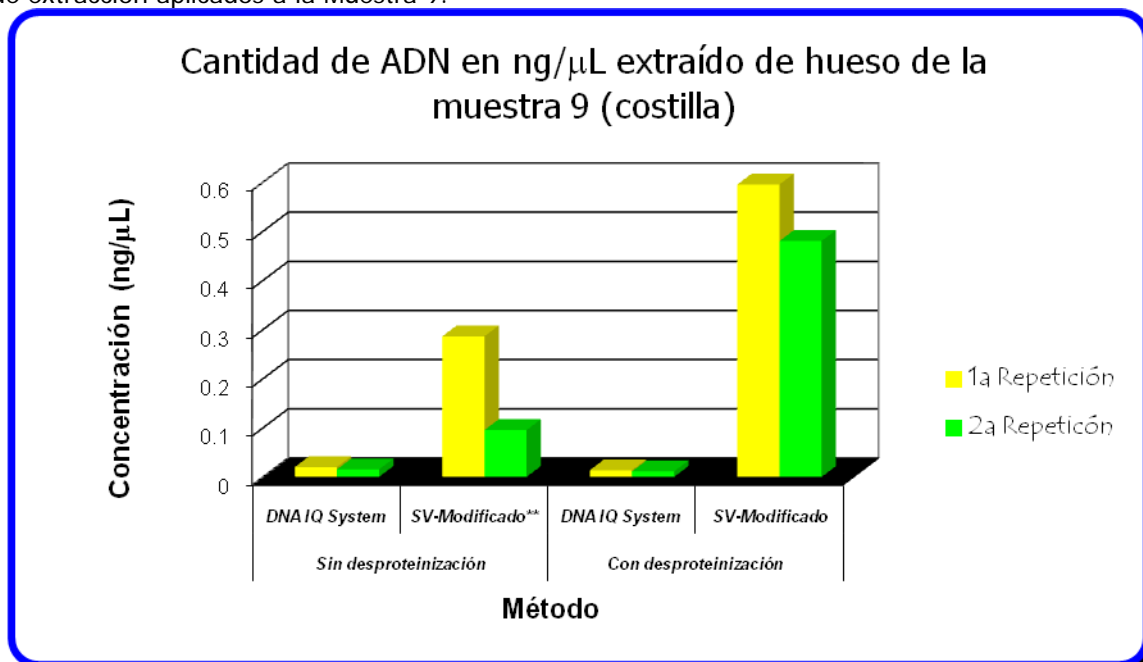
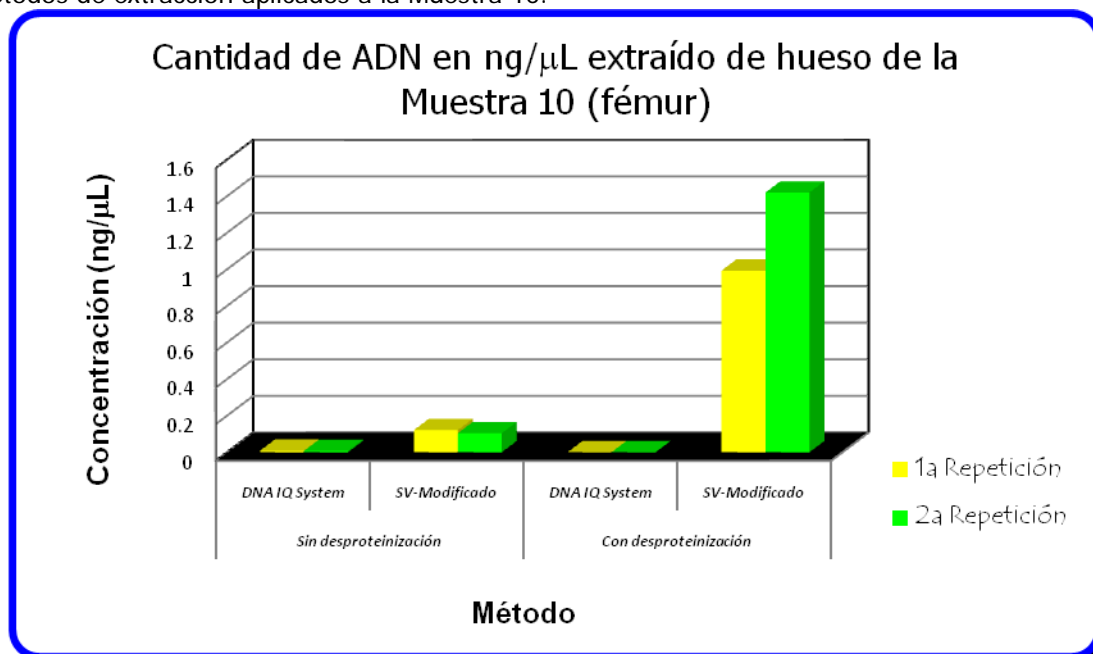


Tabla 10. Comparación de los resultados obtenidos por los 4 métodos de extracción en las dos repeticiones realizadas y determinación del perfil genético.

Muestra 10 (Fémur)						
Método		Cantidad de ADN obtenido (ng/μL)		Presencia de inhibidor		Se obtuvo perfil genético
		1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	
Sin desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.00824	0.00739	Si	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.121	0.104	Si	Si	No se obtuvo
Con desproteínezación	Purificación con <i>DNA IQ System</i> [®]	0.000682	0.000836	No	No	No se obtuvo
	Purificación con <i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] (Modificado)	0.993	1.42	No	No	Completo

Grafica 10. Comparación de la cantidad de ADN obtenida por repetición en cada uno de los métodos de extracción aplicados a la Muestra 10.



La relación de frecuencias en cuanto a presencia de inhibidor y obtención de perfil genético se muestra en forma de tablas y gráficas, observando que el método con mayor presencia de inhibidores fue *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado sin desproteínización, y el método donde se obtuvo el perfil genético completo de todas las muestras fue *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado con desproteínización.

Tabla 11. Porcentaje de la frecuencia en cuanto a la presencia de inhibidores y obtención del perfil genético en el total de las 10 muestras trabajadas por el método *DNA IQ System*[®] sin desproteínización.

<i>DNA IQ System</i> [®] sin Desproteínización			
Inhibidor	% Inhibidor	% Perfil genético	
No	70%	50%	No se obtuvo
Si	30%	20%	Parcial
		30%	Completo

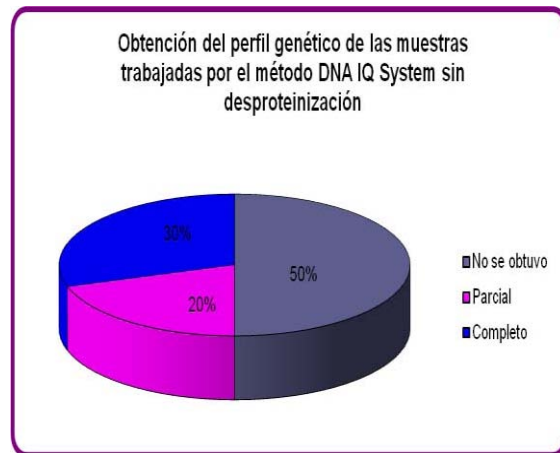
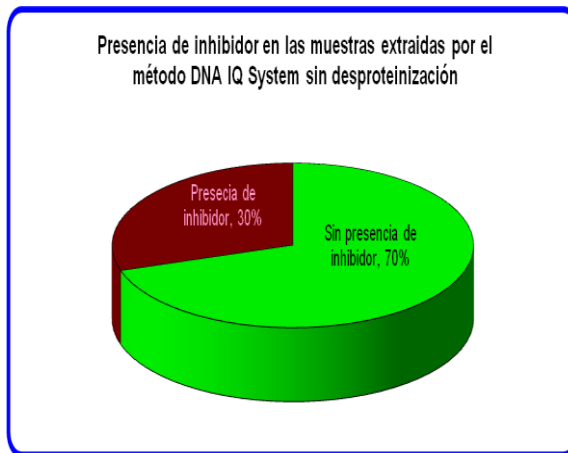


Tabla 12. Porcentaje de la frecuencia en cuanto a la presencia de inhibidores y obtención del perfil genético en el total de las 10 muestras trabajadas por el método *DNA IQ System*[®] con desproteización.

<i>DNA IQ System</i> [®] con Desproteización			
Inhibidor	% Inhibidor	% Perfil genético	
No	95%	70%	No se obtuvo
Si	5%	0%	Parcial
		30%	Completo

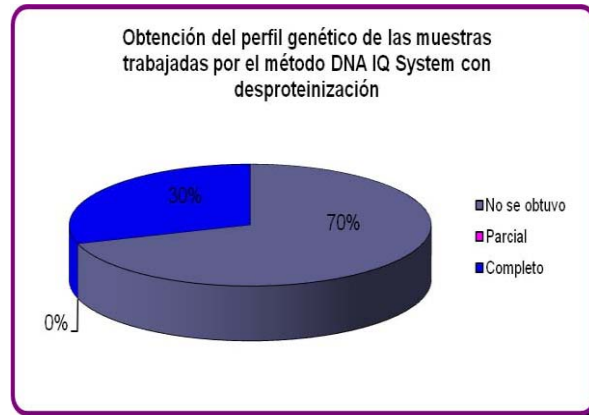
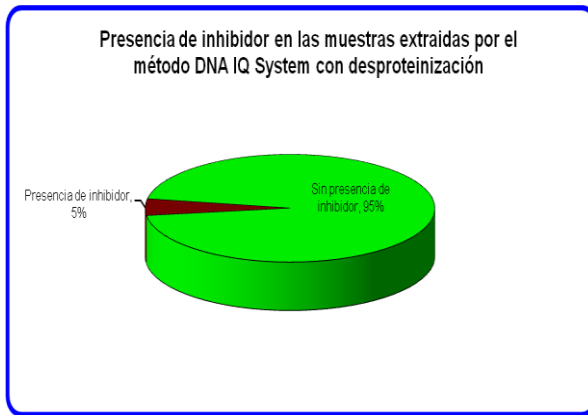


Tabla 13. Porcentaje de la frecuencia en cuanto a la presencia de inhibidores y obtención del perfil genético en el total de las 10 muestras trabajadas por el método *SV Total RNA Isolation System*[®] - Modificado sin desproteización.

<i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] modificado sin Desproteización			
Inhibidor	% Inhibidor	% Perfil genético	
No	10%	80%	No se obtuvo
Si	90%	0%	Parcial
		20%	Completo

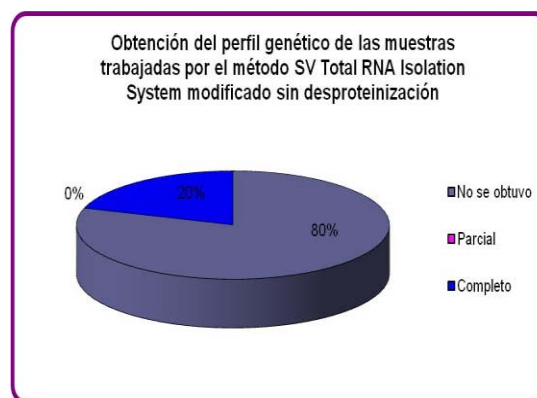
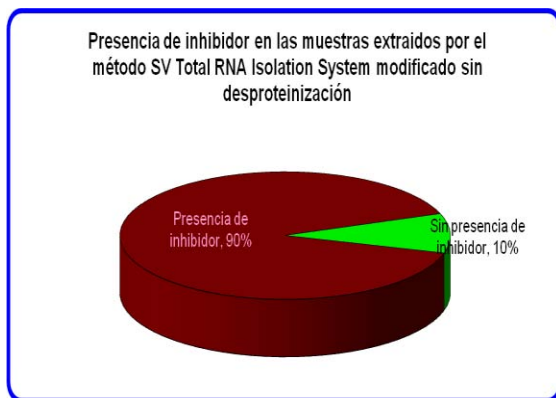
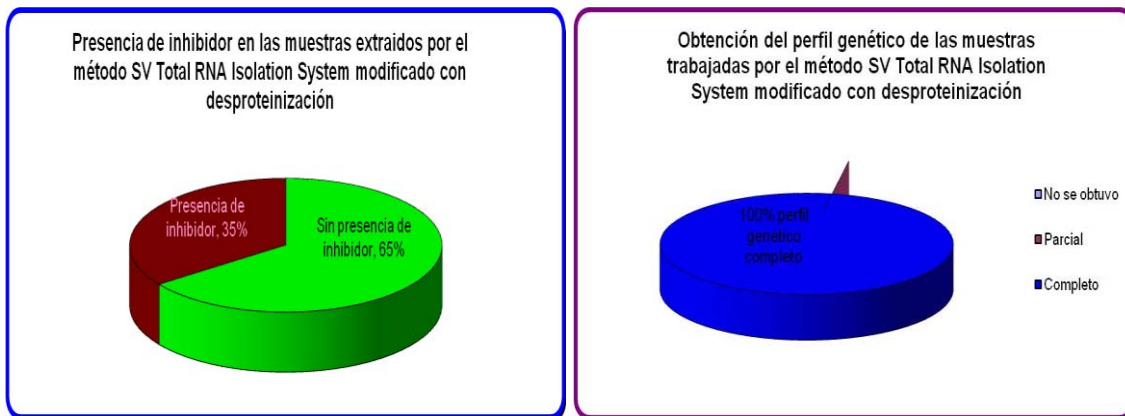


Tabla 14. Porcentaje de la frecuencia en cuanto a la presencia de inhibidores y obtención del perfil genético en el total de las 10 muestras trabajadas por el método *SV Total RNA Isolation System*[®] - Modificado con desproteinización.

<i>SV Total RNA Isolation System</i> [®] modificado con Desproteinización			
Inhibidor	% Inhibidor	% Perfil genético	
No	65%	0%	No se obtuvo
Si	35%	0%	Parcial
		100%	Completo



Para el Análisis estadístico se utilizó ANOVA de dos factores con el fin de poder observar cual de los 4 métodos utilizados fue el de mejor rendimiento de extracción de ADN, y también para poder determinar si la variación en cuanto a la cantidad de ADN entre muestras dependía o no del método y/o del tipo de elemento óseo utilizados.

Los resultados obtenidos muestran que entre los métodos hay una variación significativa entre las medias de cada uno de los rendimientos obtenidos de cada uno de los métodos; calculándose el valor de $F = 4.83749862$ cuando el valor crítico de F debería ser de 2.83874613 , según los valores establecidos para ANOVA de dos factores con $\alpha = 0.05$ y con tres grados de libertad para este estudio.

Por otro lado para cada una de las muestras en particular se obtuvo un valor de $F = 10.192299$ que fue mucho mayor que su valor crítico de $F = 2.12402895$ y una probabilidad de 5.9964×10^{-08} . Dando como resultado que el rendimiento de ADN depende del tipo de muestra utilizada. Los cálculos se muestran a continuación.

Análisis de Varianza con dos factores

RESUMEN	DNA IQ S/D	DNA IQ C/D	SV S/D	SV C/D	Total
1					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.038	0.0495	0	4.17	4.2575
Promedio	0.019	0.02475	0	2.085	0.5321875
Varianza	6.962E-05	0.00012641	0	0.00125	0.91886498
2					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	10.73	17.65	816.5	1871	2715.88
Promedio	5.365	8.825	408.25	935.5	339.485
Varianza	21.97845	7.80125	273430.125	83640.5	216995.691
3					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.1087	0.1221	1.429	5.78	7.4398
Promedio	0.05435	0.06105	0.7145	2.89	0.929975
Varianza	0.00029525	0.00053465	0.0018605	0.8712	1.67052071
4					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.188	0.8711	33.2	74.3	108.5591
Promedio	0.094	0.43555	16.6	37.15	13.5698875
Varianza	0.017672	0.28493701	30.42	673.445	363.256416
5					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.13941	0.3318	0	17.36	17.83121
Promedio	0.069705	0.1659	0	8.68	2.22890125
Varianza	0.00801251	0.04749362	0	82.4328	27.6419804
6					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.00254	3.52	0.061	3.52	7.10354
Promedio	0.00127	1.76	0.0305	1.76	0.8879425
Varianza	2.312E-07	0.0648	8.192E-05	0.0648	0.88777297
7					
Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.01013	0.3736	0.0936	1.331	1.80833
Promedio	0.005065	0.1868	0.0468	0.6655	0.22604125
Varianza	4.7045E-07	0.03987488	0.002048	0.0515205	0.09209821

8

Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.00624	0.06379	0.000834	0.589	0.659864
Promedio	0.00312	0.031895	0.000417	0.2945	0.082483
Varianza	7.6832E-06	0.00131123	3.4778E-07	0.0053045	0.01824444

9

Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.0351	0.0247	0.3812	1.075	1.516
Promedio	0.01755	0.01235	0.1906	0.5375	0.1895
Varianza	1.1045E-05	3.125E-06	0.01820232	0.0066125	0.05556247

10

Cuenta	2	2	2	2	8
Suma	0.01563	0.001518	0.225	2.413	2.655148
Promedio	0.007815	0.000759	0.1125	1.2065	0.3318935
Varianza	3.6125E-07	1.1858E-08	0.0001445	0.0911645	0.30668619

Total

Cuenta	20	20	20	20	
Suma	11.27375	23.008108	851.890634	1981.538	
Promedio	0.5636875	1.1504054	42.5945317	99.0769	
Varianza	3.85531204	7.59175742	30055.9503	86386.3368	

ANÁLISIS DE
VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	820733.481	9	91192.609	10.192299	5.9964E-08	2.12402895
Columnas	129846.305	3	43282.1017	4.83749862	0.00576827	2.83874613
Interacción	1033999.19	27	38296.2661	4.28024812	1.7571E-05	1.76633819
Dentro del grupo	357888.282	40	8947.20705			
Total	2342467.25	79				

Discusión

Se encontró que el rendimiento de ADN obtenido depende significativamente del método de extracción utilizado. Al comparar al producto de ADN conseguido en cada uno de los métodos realizados, se observa una gran diferencia en el método *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado (con desproteínización) con respecto a los otros, cuando se confronta con la concentración mínima de ADN requerida (0.025ng/ μ L). Para amplificar se requiere de al menos 0.5 ng de ADN, si se toma en cuenta que para preparar la mezcla de reacción de PCR, el volumen máximo del material genómico que puede utilizarse es 20 μ L, todo esto con el fin de poder obtener un perfil genético confiable.

De acuerdo al análisis estadístico ANOVA de dos factores, se observa que sí existen diferencias significativas entre los métodos utilizados, si se compara el valor crítico de "F" ($F=4.83749862$, valor calculado, en tanto que $F=2.83874613$, valor crítico tomado de tablas ya establecidas para ANOVA de dos factores), se puede concluir, de acuerdo a la ANOVA, que al menos uno de los métodos ha producido resultados cuya media difiere de forma estadísticamente significativa del resto de los métodos. Como se conoce, a menor valor de probabilidad, mayor seguridad de que existen diferencias significativas. El valor de probabilidad obtenido fue de $p=0.00576827$ con lo cual se confirma la existencia de una diferencia significativa ($p < 0.05$).

En cuanto a las muestras, de igual manera se observa una gran diferencia, el valor $F=10.192299$, es mayor al valor crítico ($F=2.12402895$), con el que se obtiene un valor de $p=5.9964 \times 10^{-8}$ que revela que existen diferencias significativas entre las muestras, que corresponden a diferentes tipos óseos, con diversas características.

El rendimiento en el análisis de ADN, se ve afectado por el uso de membranas de silica, los métodos *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado tanto con desproteínización como sin ella presentan los rendimientos de ADN más altos con respecto a los métodos *DNA IQ System*[®] con y sin desnaturalización. Hecho que podría explicarse haciendo si se toma en cuenta a la superficie de contacto. En los sistemas SV el efecto es mucho mayor que en los sistemas *DNA IQ*[®], que cuenta con una saturación de la resina paramagnética, que es una de las características de *DNA IQ System*[®]. Por otro lado el *DNA IQ System*[®] da productos de ADN de alta calidad en cuanto a pureza, pero las membranas *SV Total RNA Isolation System*[®] dan productos de ADN de alto peso molecular.

Además, la aplicación de la desproteínización, influye fuertemente al momento de la extracción, mostrando que la desproteínización beneficia la separación del ADN de los detritos celulares, así como de las proteínas que actúan

de igual forma como materiales contaminantes del ADN. La mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, actúa como un desnaturalizador activo, suprimiendo la solubilidad de las proteínas, haciendo que éstas precipiten, favoreciendo así la separación de los ácidos nucleicos en la fase acuosa, y las proteínas se ubicarán en la interfase presentes como un precipitado floculado. Lo anterior explica la variación en el rendimiento obtenido en cuanto a la cantidad de ADN de una misma muestra y en un mismo método al hacerlo por duplicado, si se considera como un paso crítico, al momento de separar la fase acuosa, después de la desproteización, si se tiene en cuenta que no siempre se realiza el pipeteo con la misma precisión ni exactitud, cuando se retira la fase, acuosa que se encuentra muy cercana a la vecindad de las proteínas (29-32).

En cuanto a la presencia de inhibidores, se observó que el método en el que se eliminaron en la mayoría de veces fue *DNA IQ System*[®] (con desproteización), pero éste, presentó muy poco rendimiento de ADN amplificable, con lo cual solo pudieron obtenerse 30% de los perfiles completos, del total de las muestras trabajadas por este método, y ningún perfil parcial, lo que lo hace un método poco eficaz. El método *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado (sin desproteización), fue el que presentó el mayor porcentaje de inhibidores (90%) y presentó igualmente un porcentaje muy bajo en la obtención de perfiles completos, (20%) que lo revela como un método con menor eficacia. El método *DNA IQ System*[®] (sin desproteización) presentó 30% de inhibidores y se obtuvo 30% de los perfiles completos y 20% de perfiles parciales. El método *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado (con desproteización) la presencia de inhibidores fue de 35% obteniéndose 100% de perfiles completos.

El método *DNA IQ System*[®] (sin desproteización) mostró ser el método más rápido de realizar, debido a que se requieren menor cantidad de reactivos y pasos para su realización, con lo que se previene en mayor grado la posibilidad de contaminación cruzada, pero no así como método de elección, debido a su bajo rendimiento en cuanto a la cantidad de ADN obtenido y que, en algunos casos, purifica tanto al ADN como los inhibidores de la PCR, con lo que disminuye la posibilidad de obtener un perfil genético completo. Se observó que el ADN obtenido por este método, en los casos donde se eliminan totalmente a los inhibidores de la PCR, fueron de alta calidad, como fue el caso de la muestra 7, en la que la cantidad de ADN obtenido, fue mucho menor al mínimo amplificable requerido, y aun así se pudo obtenerse el perfil genético de la muestra, aunque, como era de esperarse, el perfil genético presenta desequilibrio en los alelos, en por lo menos 6 de los marcadores, como consecuencia del efecto estocástico producido, por la escasa cantidad de ADN obtenido.

El método *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado (sin desproteización) fue el método que, en cuanto a su rapidez, como en la cantidad de reactivos y materiales a utilizar, ocupó el segundo lugar aunque para los

efectos de separación de ADN de las muestras óseas, no es la mejor opción, ya que en 9 de las 10 muestras trabajadas, se presentaron inhibidores, debido a que no hay un paso en el que se eliminen de la muestra y que, muy probablemente, el reactivo de lavado utilizado en este sistema, no es capaz de eliminar a los iones Calcio, que son los inhibidores más comunes y abundantes en las muestras óseas, debido a su composición mineral. En la muestra 3 se obtuvo el perfil genético completo, debido a que fue la única muestra que no se presentó inhibidores de la PCR. En la muestra 2 se pudo obtener el perfil genético completo, a pesar de presentar inhibidores de PCR, esto se pudo deberse a dos posibles factores: 1. Debido a la alta concentración de ADN obtenido en esta muestra, se tuvo que realizar una dilución del material genómico, para poder obtener una concentración de 0.5 ng/ μ L de ADN, después de la cuantificación, a fin de conseguir un volumen que fuera posible de tomar con las pipetas que se cuentan en el laboratorio, y que al realizar esta dilución, no solo se diluyó el material genómico, también al inhibidor, causando así que en la PCR, la polimerasa no fuera inactivada. El segundo posible factor fue que la muestra 2, presentó una concentración promedio de 408.25 ng/ μ L y el sistema *Plexor HY System*[®], refiere que en muestras de ADN humano con concentraciones mayores a 10 ng/ μ L, se puede causar un ligero retraso o demora, en la amplificación del IPC[®] causando así que se rebase el umbral de ciclo, mucho después de lo que se espera, lo que probablemente produjo la presencia de inhibidores, en el reporte de resultados del *Plexor Analysis Software*[®] (18,33).

El método *DNA IQ System*[®] (con desproteización), ocupó el tercer lugar en cuanto a tiempo y materiales utilizados, a pesar de requerir más reactivos que los dos métodos anteriores, este resultó ser el mejor método para eliminar a los inhibidores de la PCR, pero a pesar de ello, el rendimiento en cuanto a la cantidad de ADN recuperado, no es eficiente para la obtención de perfiles genéticos, lo que podría deberse a que el ADN se pierde en el transcurso de los pasos de purificación, y que debido a la previa desproteización y la posterior realización de los lavados el ADN de alto peso molecular, se perdieron en 3 de las muestras, y solo se obtuvieron 2 perfiles genéticos, a pesar de que la cuantificación mostró que la cantidad de ADN era suficiente en las 7 muestras restantes, lo que hace pensar que muy probablemente se obtuvo ADN de bajo peso molecular, que no fue suficiente para poder ser amplificado con el sistema multiplex, que requiere fragmentos de ADN de hasta 450 pb, fragmentos mucho mayores a los requeridos en el *Plexor HY System*[®] que son de 99 pb.

El método *SV Total RNA Isolation System*[®] - Modificado (con desproteización), resultó ser el mejor método, en cuanto al rendimiento de ADN obtenido, porque fue posible obtener el perfil completo de las 10 muestras estudiadas, además de que solo el 35% de ellas, presentaron inhibidores de la PCR. En la muestra que menor cantidad de ADN fue recuperado, presentó una cantidad 11.76 veces mayor que la cantidad mínima requerida para poder ser

amplificada. Los perfiles genéticos obtenidos, en su mayoría presentan buen equilibrio entre alelos heterocigotos. Sin embargo, es el método que más pasos conlleva y que más reactivos y materiales utiliza, y aún así no es una desventaja, ya que comparado con otras técnicas reportadas en la literatura, como la que involucra la desmineralización del hueso la cual conlleva varios pasos y reactivos, y que tarda hasta 15 días, tan solo para la desmineralización del mismo. Uno de los inconvenientes es no tener los cuidados pertinentes, al manejar los reactivos peligrosos como son los componentes del sistema fenol:cloroformo:isoamílico alcohol, y que debe mantenerse sumo cuidado, para evitar la contaminación cruzada por el uso de varios traspases en diversos recipientes, para obtener el ADN lo más puro posible y de alta calidad.

Al hacer el análisis de los perfiles genéticos, se observó un buen equilibrio en cuanto a los alelos heterocigotos, la principal anomalía que se registró en los perfiles genéticos, fue el decaimiento de la fluorescencia de los marcadores con los alelos de mayor tamaño, como se observó en los electroferogramas de las muestra 1, 6 y 8, posiblemente debido a la degradación del ADN, debido a diversos factores, tanto ambientales como microbiológicos, hecho que hizo más difícil obtener los alelos pertenecientes a los marcadores de mayor tamaño (19,34).

Aunado a lo anterior se concluyó que las mejores muestras para trabajar, fueron las que contienen hueso compacto y no las que estuvieron compuestas en su mayor parte por hueso esponjoso, debido a que tuvieron mayor cantidad de osteocitos. La obtención de un perfil genético completo, depende no solo del método utilizado, de la realización correcta del mismo y de la presencia de inhibidores de la PCR, también depende, en mucho, del tipo de muestra ósea estudiada, y de los factores ambientales a los que fue expuesta, ya que de esto dependerá la integridad del ADN que contenga y se obtenga. Algunas de las muestras trabajadas estuvieron expuestas a alguno de los siguientes factores: rayos solares, a la humedad ambiental, a fuego severo y una proveniente de exhumación. Debido a que en muchos de los casos, los datos del sujeto del que provenía la muestra, es información confidencial, no fue posible analizar que factor medioambiental fue el que afectó con mayor severidad al ADN, y por lo tanto, no se puede incluir esta variable en el análisis.

Conclusiones

- ❖ De acuerdo al análisis estadístico, se concluye que existieron diferencias significativas entre los métodos estudiados, debido a que el factor "F" es mayor que el valor crítico de "F", con lo cual se rechaza la hipótesis de homogeneidad del análisis de varianza, y con ello se demostró que al menos uno de los métodos, da resultados muy diferentes a los demás.
- ❖ El método con mayor eficiencia de los cuatro analizados para extraer ADN de muestras óseas, fue *SV Total RNA Isolation System*[®] – Modificado con desproteización, debido a que se obtuvieron 100% de los perfiles genéticos completos del total de las muestras trabajadas, con ello se logró identificar genéticamente, a quien en vida pertenecieron los restos óseos.
- ❖ El uso de un agente desproteizante después de la digestión de las muestras, fue de gran ayuda, no solo para eliminar las proteínas y detritos celulares presentes, sino también para retirar a los inhibidores de PCR. En este estudio en particular se utilizó la mezcla Fenol:Cloroformo:Isoamilico Alcohol, obteniéndose menor cantidad de muestras con la copurificación de inhibidores, que en las muestras donde no se utilizó este agente desproteizante.
- ❖ Es posible determinar la presencia de inhibidores de la PCR utilizando el kit *Plexor HY System*[®] en los extractos de ADN, aunque se tuvo el inconveniente, aunque de poca importancia, de que no se pudo determinar el tipo de inhibidor que se copurificó con la muestra. De acuerdo a la literatura sobre el tema, el éxito en los resultados, depende del tipo de muestra analizada.
- ❖ La obtención de un perfil genético completo depende, tanto del método de extracción utilizado, como del tipo de hueso estudiado, y de las condiciones ambientales a las que fue expuesta la muestra antes de su estudio. Con este trabajo, se deja abierta la opción de realizar un estudio, en el cual se analice qué factor medioambiental, es el que mayor daño ocasiona, y por consiguiente, la degradación que puede causar al ADN obtenido de muestras óseas. También se deja la opción de hacer la amplificación con PCR, utilizando los kits *PowerPlex EXS 17*[®] y *PowerPlex S5*[®], para determinar si se puede o no obtener un perfil genético con al menos 16 marcadores, como fue el caso de las muestras donde se obtuvo el perfil genético parcial.

Referencias

1. Rana S. Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. BUMC Proceedings 2005; 18:130-133.
2. Lorente J. Un detective llamado AND. Madrid: Ediciones Temas de hoy, 2004: 49.
3. Thompson T, Black S. Forensic Human Identification An Introduction. New York: Editorial CRC Press, 2007: 7-16.
4. Butler J, Forensic DNA Typing. 2a ed. Burlington: Elsevier Academic Pres, 2005: 2, 313-318.
5. Lee H, Ladd C. Preservation and Collection of Biological Evidence. CMJ Forum 2001; 42: 225-228.
6. Budowle B, Smith J, Moretti T, DiZinno J. DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis. Washington: BioTechniques Books Eaton Publishing, 2000: 13-14.
7. Marjanovic D, Durmic A, Haveric S, Kalamujic B, Ramic J, Pojskic N, et al. DNA Identification of Skeletal Remains from the World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia. Croat Med J 2007; 48: 7.
8. Bassetti J. PCR Inhibition An Introduction to PCR Inhibitors. Profiles in DNA 2007; 9-10.
9. Lizcano F. Fundamentos Moleculares en Medicina. Bogotá: Manual Moderno, 2004: 40-43
10. Miazato E, Soares J, Romero D. Human Identification and Analysis of DNA in Bones. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo 2004; 59: 383-388.
11. Technical Bulletin. DNA IQ System-Small Sample Casework Protocol. Part# TB296.
12. Thomas M, Jane M, Schumacher R. DNA Extraction from Bone Fragments without Pulverization. PBI Application Notes: Forensics 2002; 22: 38-43.
13. Budimlija Z, Prinz M, Zelson-Mundorff A, Wiersema J, Bartelink E, et al. World Trade Center Human Identificaion Project: Experiences with Individual Body Identification Cases. CMJ Forensic Sciences 2003; 44: 259-263.
14. Damiao J, Santos C, Simoes A. Procedimentos em exumações para investigação de vínculo genético em ossos. Rev Saúde Pública 2001; 35: 368-374.
15. Magnetismo. Microsoft Student 2008 (DVD). Microsoft Corporation 2007.
16. White D, Butler B, Creswell D, Smith C. MagneSil Paramagnetic Particles: Novel Magnetics for DNA Purification. Promega Notes, 1998; 69: 12-15.
17. Mandrekar P, Flanagan L, Tereba A. Forensic Extraction and Isolation of DNA From Hair, Tissue and Bone. Profiles in DNA 2002;
18. Technical Bulletin. DNA IQ System™ Database Protocol. Part# TB297.
19. Technical Manual. SV Total RNA Isolation System™. Part# TM048.

20. Hooper K. Promega's SV Membrane Technology: The Evolution of an Indispensable Laboratory Tool. *Promega Notes*, 2002; 82: 10-13.
21. Otto P, Kephart D, Huber S, Volkerding K. Separate Isolation of Genomic DNA y Total RNA from single samples using the SV Total RNA Isolation System. *Promega Notes* 69, 19.
22. Karp G. *Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos*. México; Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1998: 701-720.
23. Mendoza J, García A, Aguilar L. *Protocolos de Biología Molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2004:1.
24. Luque J, Herraes A. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. España; Editorial Harcourt, 2005: 188-192
25. Krenke B, Ekenberg S, Frackman S, Hoffmann K, Sprecher C, et al. Development of a Novel, Fluorescent, Two-Primer Approach to Quantitative PCR. *Profiles in DNA* 2005: 3-5.
26. Promega. *Plexor HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR System™. Part# TM293*.
27. Frackman S, Krenke B, Ekenberg S, Hoffmann K, Sprecher C, et al. *Plexor Technology: A New Chemistry for Real-Time PCR*. Promega Corporation 2006: 3-5.
28. Hooper K. *Real Power for Real-Time PCR: An Introduction to the Plexor Systems*. Promega Corporation 2005: 1-2.
29. Butler J, Buel E, Crivellente F, McCord B. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *WILEY-VCH Verlag & Co KGaA Weinheim* 2004; 25: 1397-1412.
30. Buckleton J, Triggs C, Walsh S. *Forensic DNA Evidence Interpretation*. Florida; Editorial CRC Press, 2005; 2-25.
31. Siegal J. *Forensic Science the Basics*. New York; CRC Taylor & Francis. 2007: 329- 357.
32. Tortora G, Grabowski S. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 9ª ed. México; Editorial Oxford, 2001: 164-169.
33. Kemp B, Smith D. Use of Bleach to Eliminate Contaminating DNA from the Surface of Bones and Teeth. *Forensic Science International*, 2005; 154: 53-61.
34. *Operating Manual. 6750 Freezer/Mill. SPEX CertiPrep. SN 05000 and Higher.*
35. *Technical Manual. PowerPlex 16 System™. Part# TMD012.*
36. Winter P, Hickey G, Fletcher H. *Genetics*. 2a ed. Preston; Editorial Bios, 2004: 333-339.
37. *User Guide. Thermal Cycler Temperature Verification System for GeneAmp PCR Systems™ with a 0.2 mL Sample Block. Part# 4319092 Rev. C.*
38. *GeneMapper ID Software™ Versions 3.1 and 3.2 Human Identification Analysis Tutorial. Printed USA Applied Biosystems™, 2004. Part# 4357520 Rev. A.*

39. GeneMapper ID Software™ Versions 3.1 User Guide. Printed USA Applied Biosystems™, 2004. Part# 4338775 Rev. C.
40. Promega. DNA-Based Human Identification Protocols & Applications. Promega, 2009; 14: 1-13.
41. Quantifiler Kits Tutorial. Quantifiler Human DNA™ Quantification kit – Quantifiler Y Human Male DNA™ – Quantification kit. Applied Biosystems.
42. Promega. DNA Purification Protocols & Applications Guide. Promega, 2009; 9: 1-37.
43. Krenke B, Hoffmann K, Sprecher C, Hooper K, Storts D. Plexor Technology vs. SYBR Green. Promega Corporation. 2006: 9-11.
44. Hoffmann K, Krenke B, Sprecher C, Storts D. A Comparison of Plexor and 5' Nuclease Assay Chemistries. Promega Corporation. 2006: 12-14.
45. Promega. qPCR and qRT-PCR Plexor Systems. Promega Corporation™, 2006. Part# BR173.

Anexos

A. Tablas de Cuantificación obtenidas con *Plexor HY System*[®]

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 1

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
830 A	A3	Unknown	2,46E-2	N/A	N/A									OK	Check Melts
830 A	A4	Unknown	2,53E-2	N/A	N/A									OK	Check Melts
830 A	Average		2,49E-2	N/A	N/A	N/A Below Ta...	19,2	0,48	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
830 A2	B3	Unknown	3,00E-2	N/A	N/A									OK	OK
830 A2	B4	Unknown	3,53E-2	N/A	N/A									OK	OK
830 A2	Average		3,27E-2	N/A	N/A	In Range	15,3	0,50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	OK
830 B	C3	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
830 B	C4	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
830 B	Average		N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
830 B2	D3	Unknown	2,09E0	7,90E-4	2641,5									OK	Check Melts
830 B2	D4	Unknown	2,03E0	1,45E-3	1399,5									OK	Check Melts
830 B2	Average		2,06E0	1,12E-3	1837,4	Overconc.	N/A	N/A	4,12	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
830P1	A3	Unknown	1.56E-2	N/A	N/A									OK	OK
830P1	A4	Unknown	1.06E-2	2.47E-4	42.7									OK	Check Melts
830P1	Average		1.31E-2	2.47E-4	52.8	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
830P2	B3	Unknown	1.72E-2	N/A	N/A									OK	OK
830P2	B4	Unknown	1.65E-2	N/A	N/A									OK	OK
830P2	Average		1.68E-2	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	OK
830B1	C3	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
830B1	C4	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
830B1	Average		N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
830B2	D3	Unknown	1.70E0	3.36E-4	5062.3									Check IPC	Check Melts
830B2	D4	Unknown	2.52E0	4.52E-4	5582.7									Check IPC	Check Melts
830B2	Average		2.11E0	3.94E-4	5361.0	Overconc.	N/A	N/A	4.22	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Check IPC	Check Melts

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 2

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
997 A	E3	Unknown	8,02E0	5,43E0	1,5									OK	Check Melts
997 A	E4	Unknown	9,35E0	6,41E0	1,5									OK	Check Melts
997 A	Average		8,68E0	5,92E0	1,5	Overconc.	N/A	N/A	17,37	Overconc.	N/A	N/A	11,85	OK	Check Melts
997 A2	F3	Unknown	9,95E0	7,78E0	1,3									OK	OK
997 A2	F4	Unknown	1,17E1	8,44E0	1,4									OK	OK
997 A2	Average		1,08E1	8,11E0	1,3	Overconc.	N/A	N/A	21,65	Overconc.	N/A	N/A	16,22	OK	OK
997 B	G3	Unknown	3,98E1	5,63E-2	707,8									Check IPC	Check Melts
997 B	G4	Unknown	3,72E1	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
997 B	Average		3,85E1	5,63E-2	684,5	Overconc.	N/A	N/A	77,07	In Range	8,9	0,50	N/A	Check IPC	Check Melts
997 B2	H3	Unknown	6,82E2	4,47E2	1,5									Check IPC	Check Melts
997 B2	H4	Unknown	7,80E2	3,97E2	2,0									Check IPC	Check Melts
997 B2	Average		7,31E2	4,22E2	1,7	Overconc.	N/A	N/A	1461,59	Overconc.	N/A	N/A	844,01	Check IPC	Check Melts

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
2-997*1	A5	Unknown	1.75E0	7.37E-1	2.4									OK	OK
2-997*1	A6	Unknown	2.36E0	1.25E0	1.9									OK	OK
2-997*1	Average		2.05E0	9.96E-1	2.1	Overconc.	N/A	N/A	4.11	In Range	0.5	0.50	N/A	OK	OK
2-997*2	B5	Unknown	9.83E-2	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
2-997*2	B6	Unknown	1.36E1	2.58E0	5.3									Check IPC	Check Melts
2-997*2	Average		6.85E0	2.58E0	2.7	Overconc.	N/A	N/A	13.69	Overconc.	N/A	N/A	5.16	Check IPC	Check Melts
2-997B1	C5	Unknown	8.33E1	8.99E-1	92.7									Check IPC	OK
2-997B1	C6	Unknown	7.22E1	1.45E0	49.8									Check IPC	OK
2-997B1	Average		7.78E1	1.17E0	66.2	Overconc.	N/A	N/A	155.54	Above Target	0.5	0.59	N/A	Check IPC	OK
2-997B2	D5	Unknown	1.11E3	7.46E2	1.5									Check IPC	OK
2-997B2	D6	Unknown	1.17E3	7.71E2	1.5									Check IPC	OK
2-997B2	Average		1.14E3	7.58E2	1.5	Overconc.	N/A	N/A	2284.90	Overconc.	N/A	N/A	1516.93	Check IPC	OK

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 3

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1031 A	E5	Unknown	6,56E-2	7,05E-2	0,9									OK	Check Melts
1031 A	E6	Unknown	6,75E-2	5,35E-2	1,3									OK	Check Melts
1031 A	Average		6,65E-2	6,20E-2	1,1	In Range	7,5	0,50	N/A	In Range	8,1	0,50	N/A	OK	Check Melts
1031 A2	F5	Unknown	7,62E-2	6,62E-2	1,2									OK	Check Melts
1031 A2	F6	Unknown	7,87E-2	5,93E-2	1,3									OK	Check Melts
1031 A2	Average		7,74E-2	6,27E-2	1,2	In Range	6,5	0,50	N/A	In Range	8,0	0,50	N/A	OK	Check Melts
1031 B	G5	Unknown	7,77E-1	5,86E-1	1,3									OK	Check Melts
1031 B	G6	Unknown	5,91E-1	4,60E-1	1,3									OK	Check Melts
1031 B	Average		6,84E-1	5,23E-1	1,3	In Range	0,7	0,50	N/A	In Range	1,0	0,50	N/A	OK	Check Melts
1031 B2	H5	Unknown	3,55E0	2,90E0	1,2									OK	Check Melts
1031 B2	H6	Unknown	3,55E0	2,25E0	1,6									OK	Check Melts
1031 B2	Average		3,55E0	2,58E0	1,4	Overconc.	N/A	N/A	7,10	Overconc.	N/A	N/A	5,16	OK	Check Melts

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1031A1	A3	Unknown	4.31E-2	3.99E-2	1.1									OK	OK
1031A1	E3	Unknown	4.13E-2	3.97E-2	1.0									OK	OK
1031A1	Average		4.22E-2	3.98E-2	1.1	In Range	11.8	0.50	N/A	In Range	12.6	0.50	N/A	OK	OK
1031A2	B3	Unknown	4.26E-2	4.92E-2	0.9									OK	OK
1031A2	F3	Unknown	4.67E-2	3.70E-2	1.3									OK	OK
1031A2	Average		4.47E-2	4.31E-2	1.0	In Range	11.2	0.50	N/A	In Range	11.6	0.50	N/A	OK	OK
1031B1	C3	Unknown	7.03E-1	7.31E-1	1.0									OK	OK
1031B1	G3	Unknown	7.86E-1	7.88E-1	1.0									OK	OK
1031B1	Average		7.45E-1	7.59E-1	1.0	In Range	0.7	0.50	N/A	In Range	0.7	0.50	N/A	OK	OK
1031B2	D3	Unknown	1.69E0	2.64E0	0.6									OK	OK
1031B2	H3	Unknown	2.78E0	3.12E0	0.9									OK	OK
1031B2	Average		2.23E0	2.88E0	0.8	Overconc.	N/A	N/A	4.47	Overconc.	N/A	N/A	5.76	OK	OK

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 4

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1-1039*1	A9	Unknown	1.97E-1	N/A	N/A									OK	OK
1-1039*1	A10	Unknown	1.80E-1	N/A	N/A									OK	OK
1-1039*1	Average		1.88E-1	N/A	N/A	In Range	2.7	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1-1039*2	B9	Unknown	5.89E-2	N/A	N/A									OK	OK
1-1039*2	B10	Unknown	5.73E-2	N/A	N/A									OK	OK
1-1039*2	Average		5.81E-2	N/A	N/A	In Range	8.6	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1-1039B1	C9	Unknown	2.20E1	N/A	N/A									Check IPC	OK
1-1039B1	C10	Unknown	1.55E1	N/A	N/A									Check IPC	OK
1-1039B1	Average		1.88E1	N/A	N/A	Overconc.	N/A	N/A	37.55	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1-1039B2	D9	Unknown	1.25E1	N/A	N/A									Check IPC	OK
1-1039B2	D10	Unknown	1.29E1	N/A	N/A									Check IPC	OK
1-1039B2	Average		1.27E1	N/A	N/A	Overconc.	N/A	N/A	25.37	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
2-1039*1	E9	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1039*1	E10	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1039*1	Average		N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
2-1039*2	F9	Unknown	8.04E-1	N/A	N/A									OK	OK
2-1039*2	F10	Unknown	8.22E-1	N/A	N/A									OK	OK
2-1039*2	Average		8.13E-1	N/A	N/A	In Range	0.6	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	OK
2-1039B1	G9	Unknown	1.74E1	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1039B1	G10	Unknown	2.36E1	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1039B1	Average		2.05E1	N/A	N/A	Overconc.	N/A	N/A	40.99	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
2-1039B2	H9	Unknown	5.88E1	1.17E-4	502584.3									OK	Check Melts
2-1039B2	H10	Unknown	5.22E1	4.15E-4	125795.4									OK	Check Melts
2-1039B2	Average		5.55E1	2.66E-4	208656.4	Overconc.	N/A	N/A	110.94	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 5

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1066*1	E5	Unknown	1.43E-1	7.33E-2	2.0									OK	OK
1066*1	E6	Unknown	1.23E-1	4.57E-2	2.7									OK	OK
1066*1	Average		1.33E-1	5.95E-2	2.2	In Range	3.8	0.50	N/A	In Range	8.4	0.50	N/A	OK	OK
1066*2	F5	Unknown	3.72E-1	1.45E-1	2.6									OK	OK
1066*2	F6	Unknown	2.69E-1	1.17E-1	2.3									OK	OK
1066*2	Average		3.20E-1	1.31E-1	2.4	In Range	1.6	0.50	N/A	In Range	3.8	0.50	N/A	OK	OK
1066B1	G5	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
1066B1	G6	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
1066B1	Average		N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1066B2	H5	Unknown	1.61E1	6.82E0	2.4									Check IPC	OK
1066B2	H6	Unknown	1.40E1	3.92E0	3.6									Check IPC	OK
1066B2	Average		1.51E1	5.37E0	2.8	Overconc.	N/A	N/A	30.13	Overconc.	N/A	N/A	10.74	Check IPC	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1066*1	F5	Unknown	7.51E-3	2.90E-3	2.6									OK	OK
1066*1	F6	Unknown	5.31E-3	2.70E-3	2.0									OK	OK
1066*1	Average		6.41E-3	2.80E-3	2.3	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underco...	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1066*2	G5	Unknown	1.19E-2	4.47E-3	2.7									OK	OK
1066*2	G6	Unknown	1.17E-2	3.26E-3	3.6									OK	OK
1066*2	Average		1.18E-2	3.87E-3	3.0	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underco...	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1066B1	H5	Unknown	1.67E-3	N/A	N/A									Check IPC	OK
1066B1	H6	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
1066B1	Average		1.67E-3	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1066B2	A7	Unknown	2.48E0	7.38E-1	3.4									OK	OK
1066B2	A8	Unknown	2.04E0	2.83E-1	7.2									OK	OK
1066B2	Average		2.26E0	5.10E-1	4.4	Overconc.	N/A	N/A	4.52	In Range	1.0	0.50	N/A	OK	OK

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 6

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1173*2	A9	Unknown	1.83E-3	1.56E-3	1.2									OK	OK
1173*2	D9	Unknown	8.76E-4	3.31E-3	0.3									OK	OK
1173*2	Average		1.35E-3	2.43E-3	0.6	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1173*1	H7	Unknown	1.09E-3	1.68E-3	0.6									OK	OK
1173*1	H8	Unknown	7.68E-4	2.64E-3	0.3									OK	OK
1173*1	Average		9.30E-4	2.16E-3	0.4	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1173B2	C9	Unknown	1.67E0	2.26E0	0.7									OK	OK
1173B2	F9	Unknown	1.48E0	1.91E0	0.8									OK	OK
1173B2	Average		1.58E0	2.08E0	0.8	Above Ta...	0.5	0.79	N/A	Overconc.	N/A	N/A	4.16	OK	OK
1173B1	B9	Unknown	2.93E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
1173B1	E9	Unknown	4.46E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
1173B1	Average		3.69E-2	N/A	N/A	In Range	13.5	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1173*1	A5	Unknown	1.86E-3	1.73E-3	1.1									OK	Check Melts
1173*1	A6	Unknown	1.35E-3	1.53E-3	0.9									OK	Check Melts
1173*1	Average		1.61E-3	1.63E-3	1.0	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
1173*2	B5	Unknown	1.41E-3	2.82E-3	0.5									OK	Check Melts
1173*2	B6	Unknown	1.63E-3	2.09E-3	0.8									OK	Check Melts
1173*2	Average		1.52E-3	2.46E-3	0.6	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
1173B1	C5	Unknown	2.77E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
1173B1	C6	Unknown	2.05E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
1173B1	Average		2.41E-2	N/A	N/A	Below Target	19.2	0.46	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1173B2	D5	Unknown	2.13E0	3.22E0	0.7									OK	OK
1173B2	D6	Unknown	1.75E0	2.81E0	0.6									OK	OK
1173B2	Average		1.94E0	3.02E0	0.6	Above Target	0.5	0.97	N/A	Overconc.	N/A	N/A	6.04	OK	OK

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 7

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1216*1	A3	Unknown	4,61E-3	1,32E-3	3,5									Check IPC	Check Melts
1216*1	A4	Unknown	4,55E-3	N/A	N/A									Check IPC	OK
1216*1	Average		4,58E-3	1,32E-3	3,5	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Check IPC	Check Melts
1216*2	B3	Unknown	3,60E-1	1,95E-1	1,9									OK	OK
1216*2	B4	Unknown	2,95E-1	1,86E-1	1,6									OK	OK
1216*2	Average		3,28E-1	1,90E-1	1,7	In Range	1,5	0,50	N/A	In Range	2,6	0,50	N/A	OK	OK
1216B1	C3	Unknown	8,43E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
1216B1	C4	Unknown	7,33E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
1216B1	Average		7,88E-2	N/A	N/A	In Range	6,3	0,50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1216B2	D3	Unknown	4,95E-1	1,97E-1	2,5									OK	OK
1216B2	D4	Unknown	5,16E-1	2,18E-1	2,4									OK	OK
1216B2	Average		5,05E-1	2,08E-1	2,4	In Range	1,0	0,50	N/A	In Range	2,4	0,50	N/A	OK	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
2-1216*1	E3	Unknown	6,15E-3	2,14E-3	2,9									OK	OK
2-1216*1	E4	Unknown	4,94E-3	2,80E-3	1,8									OK	OK
2-1216*1	Average		5,55E-3	2,47E-3	2,2	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	OK
2-1216*2	F3	Unknown	4,45E-2	1,95E-2	2,3									OK	OK
2-1216*2	F4	Unknown	4,66E-2	1,97E-2	2,4									OK	OK
2-1216*2	Average		4,56E-2	1,96E-2	2,3	In Range	11,0	0,50	N/A	Below Target	19,2	0,38	N/A	OK	OK
2-1216B1	G3	Unknown	1,52E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1216B1	G4	Unknown	1,44E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1216B1	Average		1,48E-2	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
2-1216B2	H3	Unknown	7,71E-1	2,91E-1	2,6									OK	OK
2-1216B2	H4	Unknown	8,81E-1	2,89E-1	3,0									OK	OK
2-1216B2	Average		8,26E-1	2,90E-1	2,8	In Range	0,6	0,50	N/A	In Range	1,7	0,50	N/A	OK	OK

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 8

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1217*1	A5	Unknown	1,59E-3	7,47E-4	2,1									Check IPC	Check Melts
1217*1	A6	Unknown	7,33E-4	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
1217*1	Average		1,16E-3	7,47E-4	1,6	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Check IPC	Check Melts
1217*2	B5	Unknown	6,41E-2	4,00E-2	1,6									OK	OK
1217*2	B6	Unknown	5,08E-2	2,19E-2	2,3									OK	OK
1217*2	Average		5,75E-2	3,10E-2	1,9	In Range	8,7	0,50	N/A	In Range	16,2	0,50	N/A	OK	OK
1217B1	C5	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
1217B1	C6	Unknown	N/A	N/A	N/A									Check IPC	OK
1217B1	Average		N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1217B2	D5	Unknown	2,33E-1	7,69E-2	3,0									Check IPC	OK
1217B2	D6	Unknown	2,53E-1	3,19E-2	7,9									Check IPC	OK
1217B2	Average		2,43E-1	5,44E-2	4,5	In Range	2,1	0,50	N/A	In Range	9,2	0,50	N/A	Check IPC	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
2-1217*1	E5	Unknown	4,49E-3	2,60E-4	17,3									OK	Check Melts
2-1217*1	E6	Unknown	5,68E-3	5,42E-4	10,5									OK	OK
2-1217*1	Average		5,08E-3	4,01E-4	12,7	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
2-1217A2	F5	Unknown	5,75E-3	2,90E-3	2,0									OK	OK
2-1217A2	F6	Unknown	6,84E-3	2,84E-3	2,4									OK	OK
2-1217A2	Average		6,29E-3	2,87E-3	2,2	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	OK
2-1217B1	G5	Unknown	4,58E-4	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
2-1217B1	G6	Unknown	1,21E-3	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
2-1217B1	Average		8,34E-4	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	Check Melts
2-1217B2	H5	Unknown	3,61E-1	1,43E-1	2,5									Check IPC	OK
2-1217B2	H6	Unknown	3,32E-1	1,48E-2	22,5									Check IPC	OK
2-1217B2	Average		3,46E-1	7,90E-2	4,4	In Range	1,4	0,50	N/A	In Range	6,3	0,50	N/A	Check IPC	OK

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 9

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1232*1	A7	Unknown	1.68E-2	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
1232*1	A8	Unknown	2.30E-2	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
1232*1	Average		1.99E-2	N/A	N/A	Below Target	19.2	0.38	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	Check Melts
1232*2	B7	Unknown	1.25E-2	N/A	N/A									OK	OK
1232*2	B8	Unknown	1.48E-2	2.44E-4	60.5									OK	Check Melts
1232*2	Average		1.36E-2	2.44E-4	55.9	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
1232B1	C7	Unknown	2.41E-1	N/A	N/A									Check IPC	OK
1232B1	C8	Unknown	3.32E-1	N/A	N/A									Check IPC	OK
1232B1	Average		2.86E-1	N/A	N/A	In Range	1.7	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1232B2	D7	Unknown	5.22E-1	N/A	N/A									OK	OK
1232B2	D8	Unknown	6.67E-1	N/A	N/A									OK	OK
1232B2	Average		5.95E-1	N/A	N/A	In Range	0.8	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	OK	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
2-1232*1	E7	Unknown	1.27E-2	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
2-1232*1	E8	Unknown	1.78E-2	N/A	N/A									Check IPC	Check Melts
2-1232*1	Average		1.52E-2	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	Check Melts
2-1232*2	F7	Unknown	1.19E-2	N/A	N/A									OK	OK
2-1232*2	F8	Unknown	1.03E-2	2.39E-4	43.0									OK	Check Melts
2-1232*2	Average		1.11E-2	2.39E-4	46.4	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts
2-1232B1	G7	Unknown	5.23E-2	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1232B1	G8	Unknown	1.38E-1	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1232B1	Average		9.52E-2	N/A	N/A	In Range	5.3	0.50	N/A	No Target	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
2-1232B2	H7	Unknown	5.01E-1	N/A	N/A									OK	OK
2-1232B2	H8	Unknown	4.59E-1	1.20E-4	3831.4									OK	Check Melts
2-1232B2	Average		4.80E-1	1.20E-4	4005.6	In Range	1.0	0.50	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	Check Melts

Resultado de la Cuantificación de la primera y segunda extracción de la Muestra 10

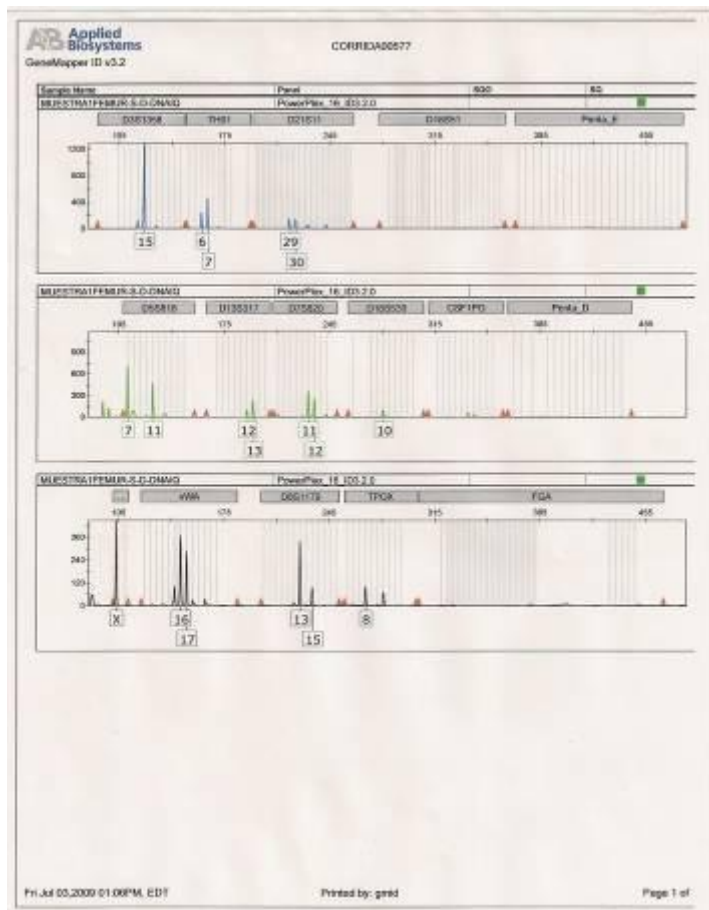
Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
1-1258*1	A11	Unknown	4.08E-3	4.01E-3	1.0									Check IPC	OK
1-1258*1	A12	Unknown	1.24E-2	5.97E-3	2.1									Check IPC	OK
1-1258*1	Average		8.24E-3	4.99E-3	1.7	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1-1258*2	B11	Unknown	2.08E-4	2.66E-3	0.1									OK	OK
1-1258*2	B12	Unknown	1.16E-3	1.95E-3	0.6									OK	OK
1-1258*2	Average		6.82E-4	2.31E-3	0.3	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	OK
1-1258B1	C11	Unknown	1.23E-1	1.84E-4	665.9									Check IPC	OK
1-1258B1	C12	Unknown	1.20E-1	1.96E-4	612.6									Check IPC	OK
1-1258B1	Average		1.21E-1	1.90E-4	638.4	In Range	4.1	0.50	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
1-1258B2	D11	Unknown	9.92E-1	2.10E0	0.5									OK	OK
1-1258B2	D12	Unknown	9.95E-1	2.15E0	0.5									OK	OK
1-1258B2	Average		9.93E-1	2.12E0	0.5	In Range	0.5	0.50	N/A	Overconc.	N/A	N/A	N/A	4.24	OK

Sample Name	Location	Sample Type	[Auto]	[Y]	[Auto]/[Y]	Auto STR Dilution Status	Auto STR Volume	Auto STR Quantity	Auto STR Dilution Factor	Y STR Dilution Status	Y STR Volume	Y STR Quantity	Y STR Dilution Factor	IPC Status	Curves Status
2-1258*1	E11	Unknown	6.70E-3	2.10E-2	0.3									OK	OK
2-1258*1	E12	Unknown	8.07E-3	2.21E-2	0.4									OK	OK
2-1258*1	Average		7.39E-3	2.16E-2	0.3	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Below Target	19.2	0.41	N/A	OK	OK
2-1258*2	F11	Unknown	9.02E-4	1.54E-3	0.6									OK	OK
2-1258*2	F12	Unknown	7.71E-4	2.56E-3	0.3									OK	OK
2-1258*2	Average		8.36E-4	2.05E-3	0.4	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	OK	OK
2-1258B1	G11	Unknown	1.10E-1	N/A	N/A									Check IPC	OK
2-1258B1	G12	Unknown	9.81E-2	3.29E-4	298.6									Check IPC	OK
2-1258B1	Average		1.04E-1	3.29E-4	316.0	In Range	4.8	0.50	N/A	Underconc.	N/A	N/A	N/A	Check IPC	OK
2-1258B2	H11	Unknown	1.47E0	3.36E0	0.4									OK	OK
2-1258B2	H12	Unknown	1.37E0	2.57E0	0.5									OK	OK
2-1258B2	Average		1.42E0	2.97E0	0.5	Above Target	0.5	0.71	N/A	Overconc.	N/A	N/A	N/A	5.94	OK

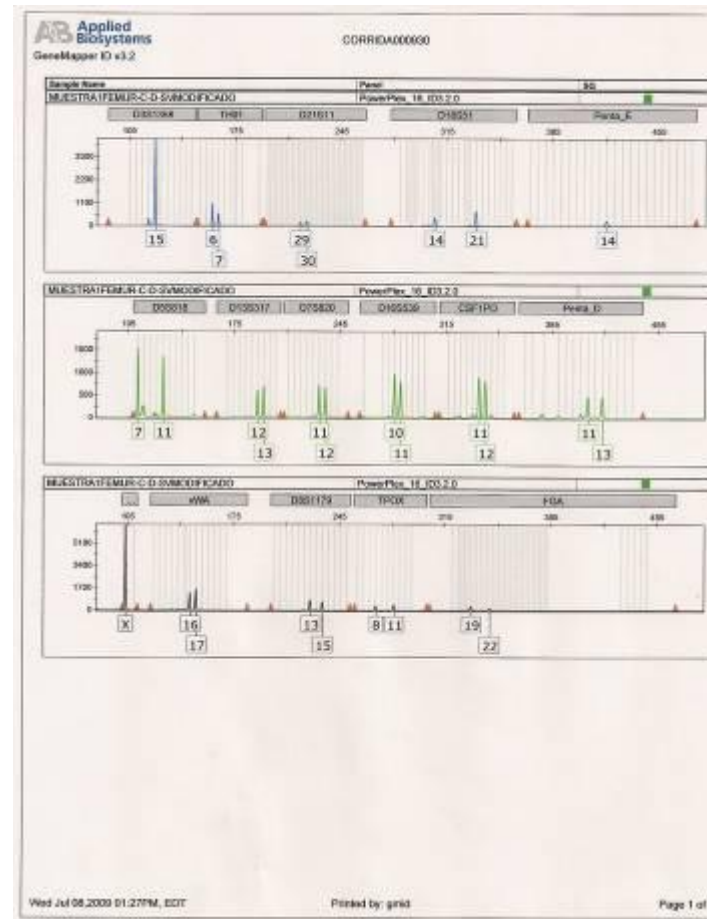
B. Perfiles Genéticos

Muestra 1 (Fémur)

DNA IQ System® sin desnaturalización

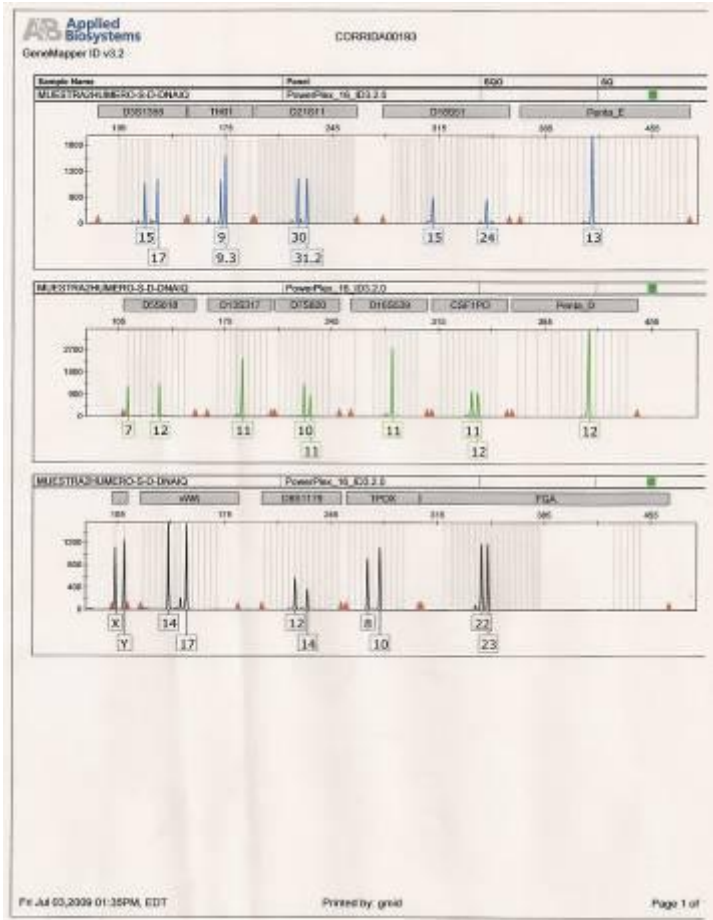


SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización

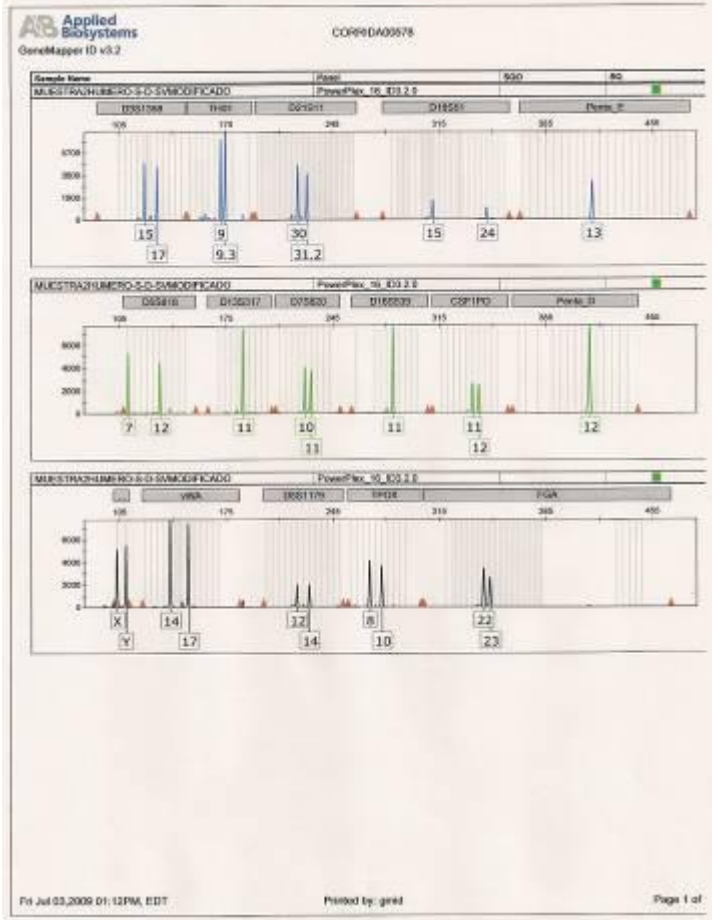


Muestra 2 (Número)

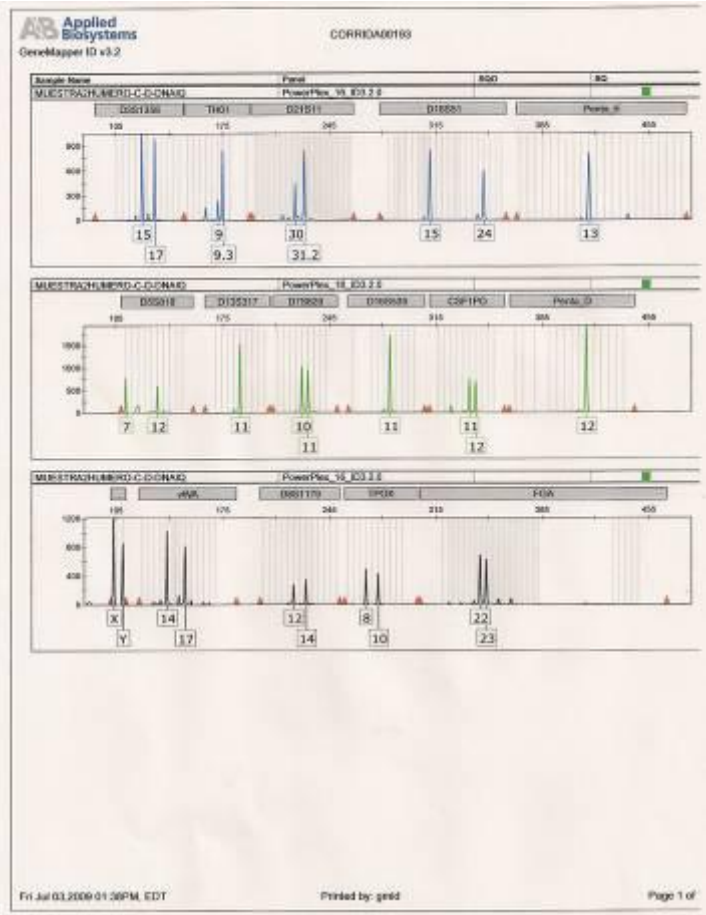
DNA IQ System[®] sin desnaturalización



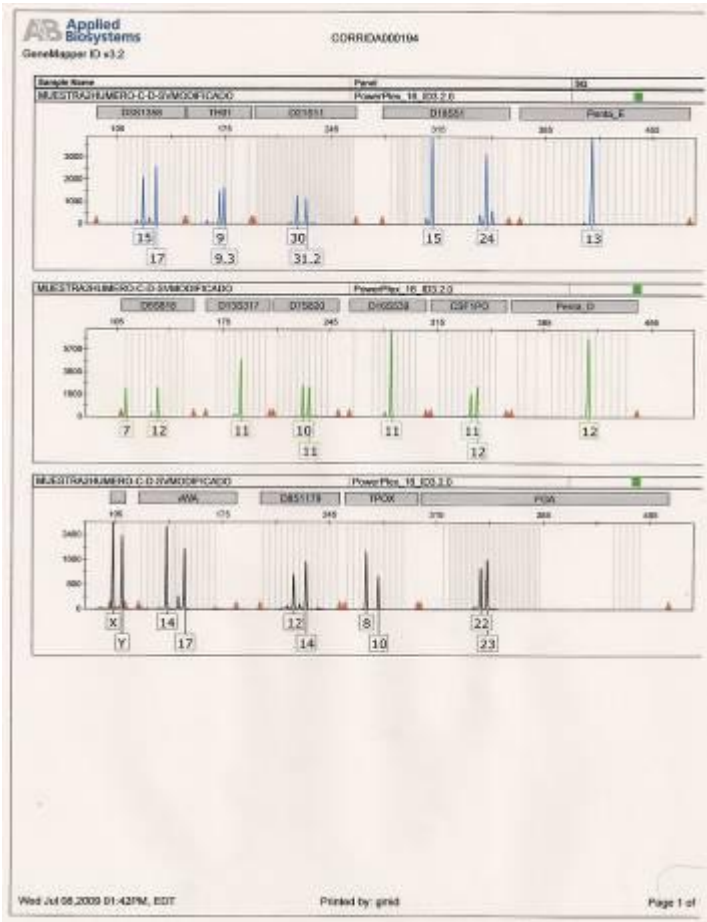
SV Total RNA Isolation System[®] – Modificado sin desnaturalización



DNA IQ System® con desnaturalización

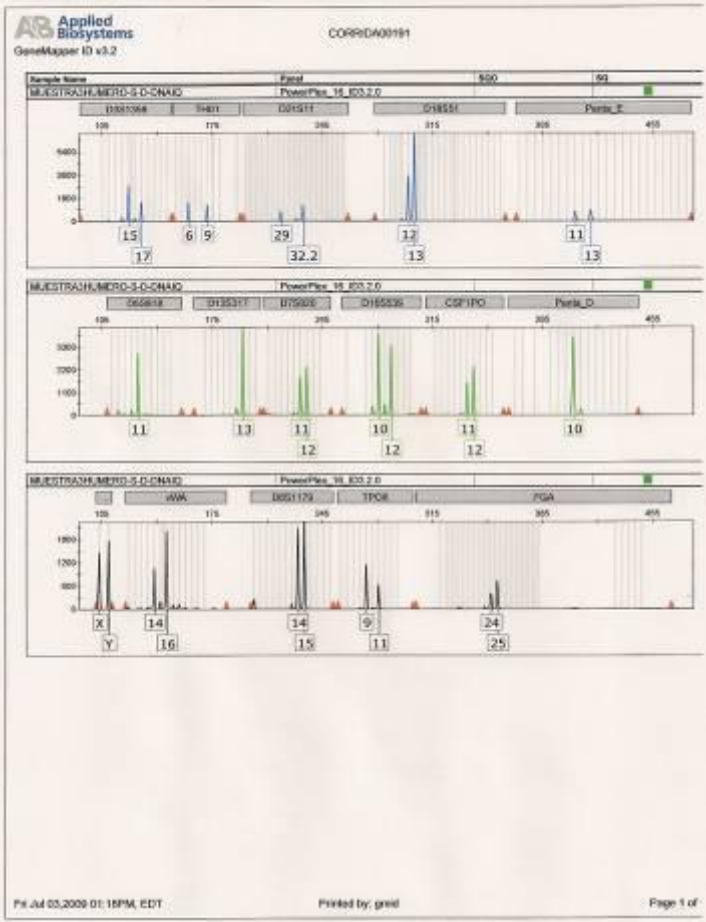


SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización

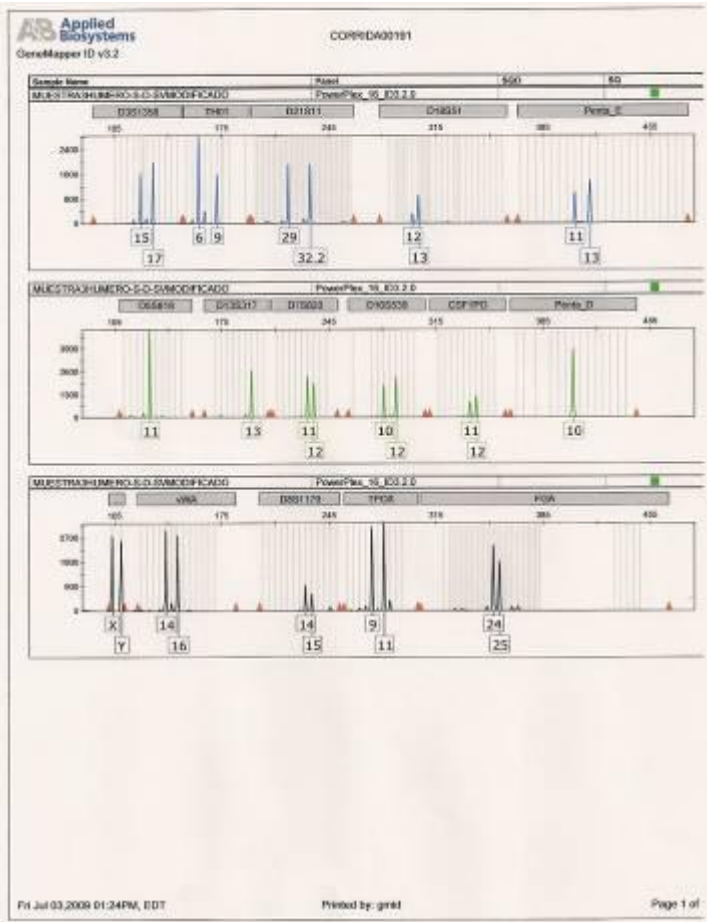


Muestra 3 (Número)

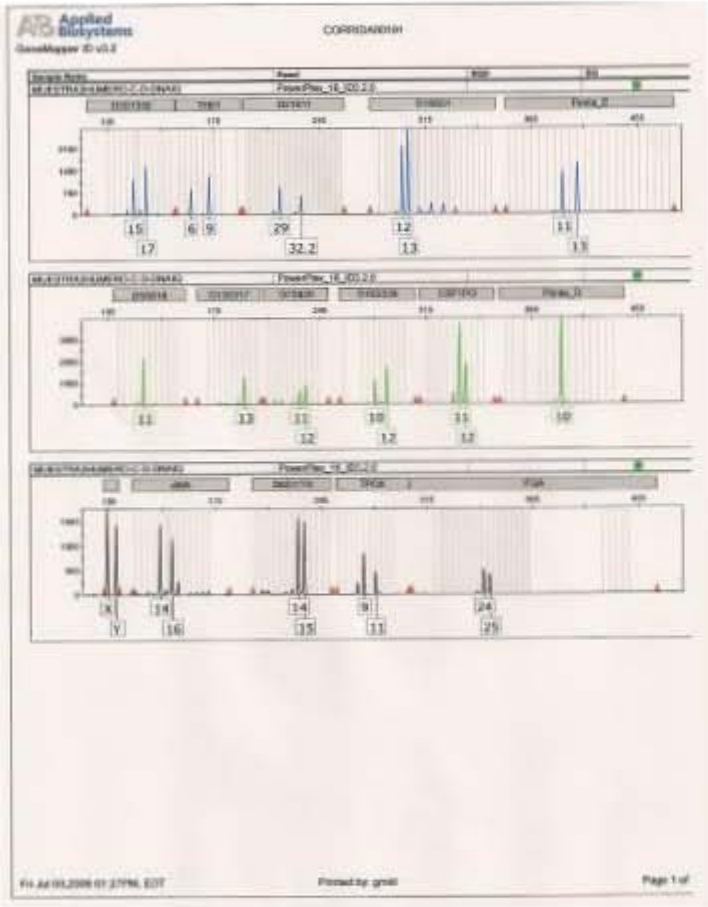
DNA IQ System® sin desnaturalización



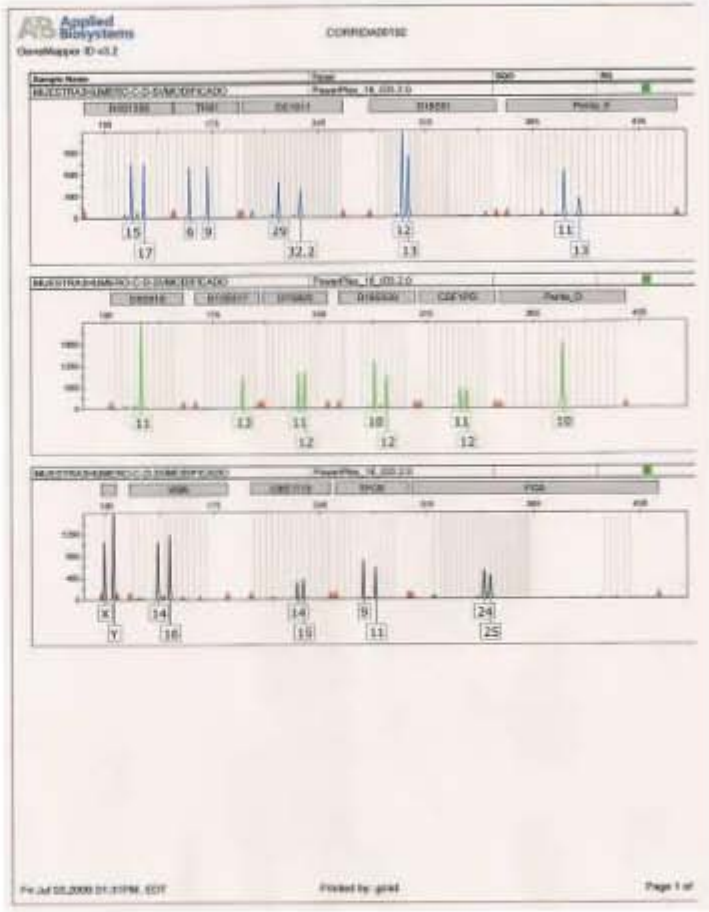
SV Total RNA Isolation System® – Modificado sin desnaturalización



DNA IQ System® con desnaturalización

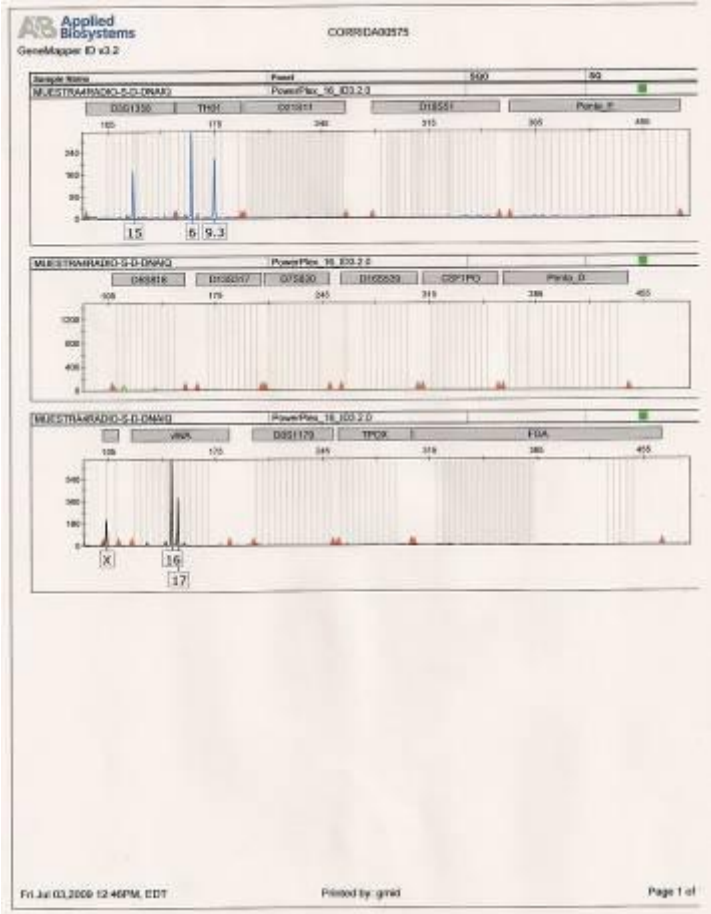


SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización

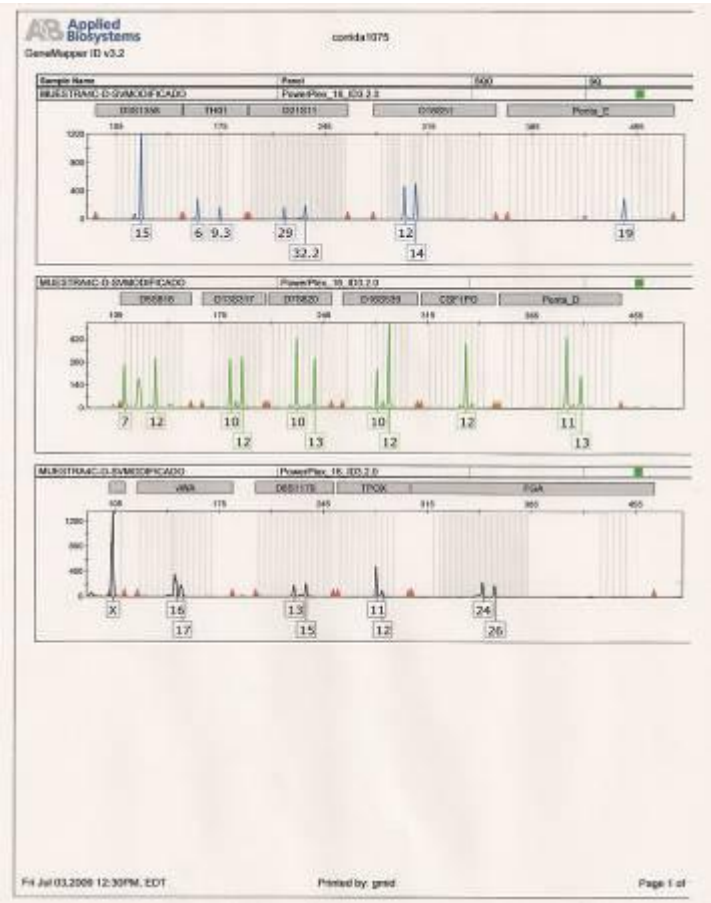


Muestra 4 (Radio)

DNA IQ System® sin desnaturalización

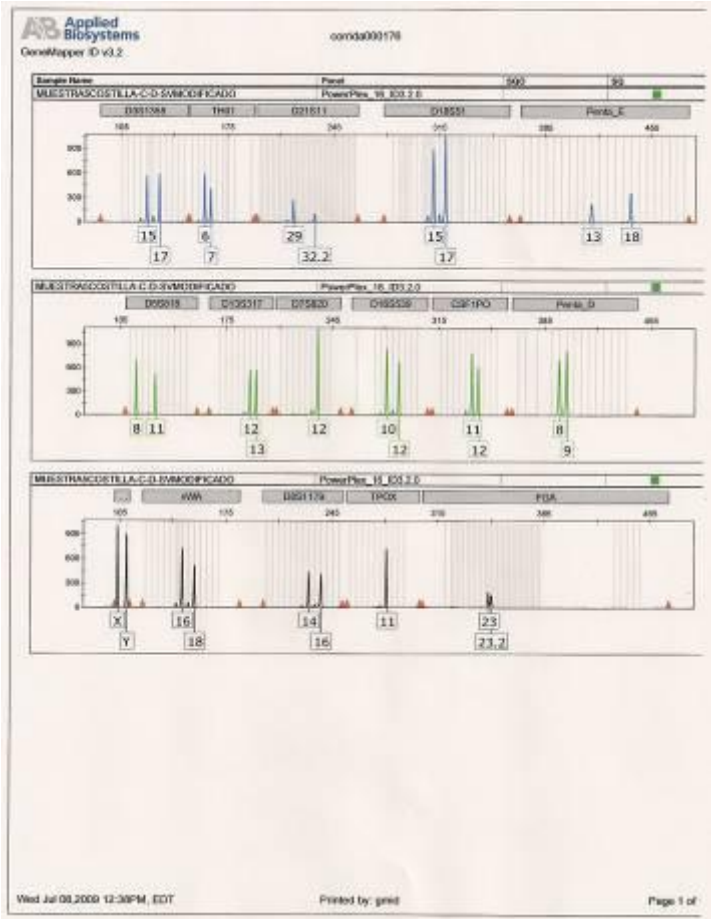


SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización



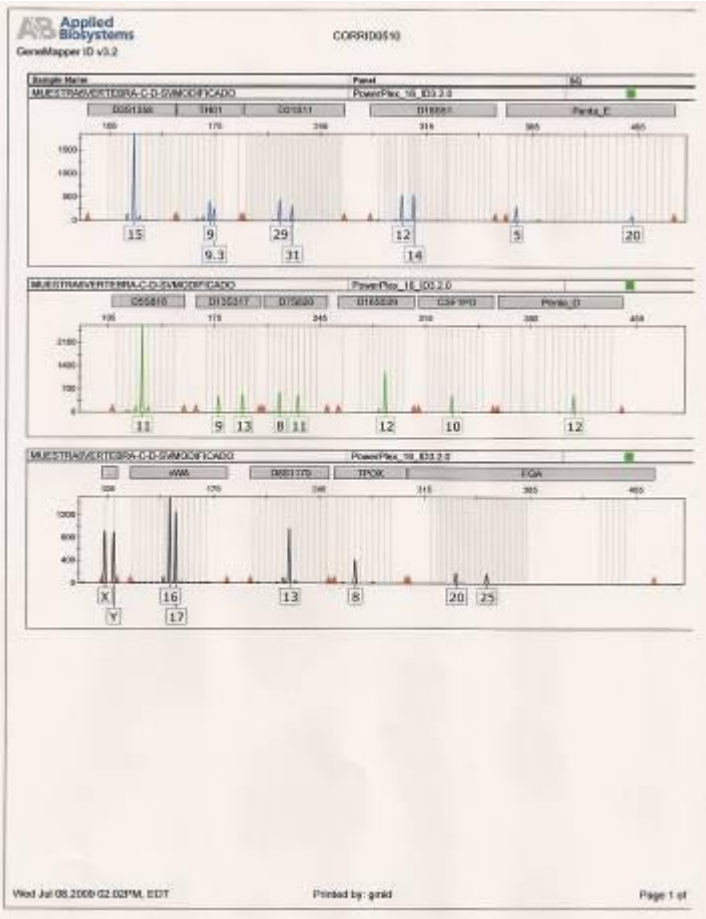
Muestra 5 (Costilla)

SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización



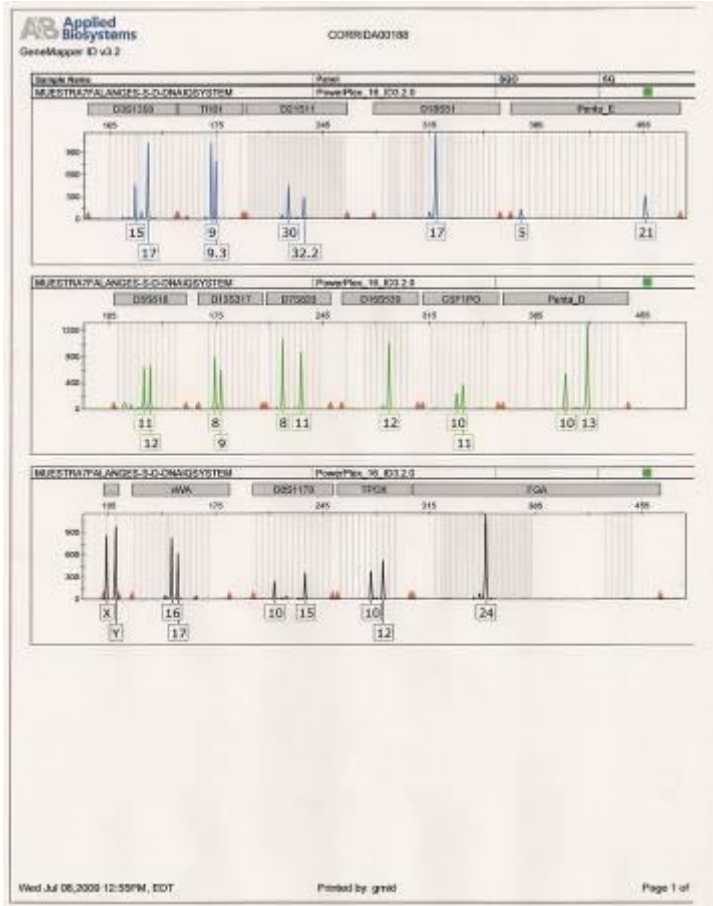
Muestra 6 (Vértebra)

SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización

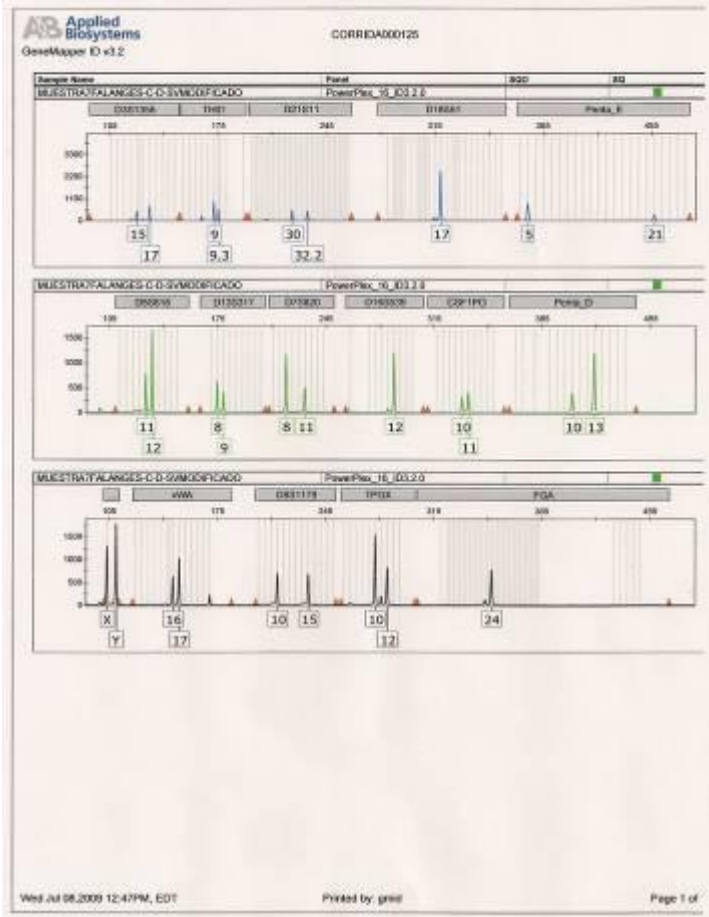


Muestra 7 (Falanges)

DNA IQ System® sin desnaturalización

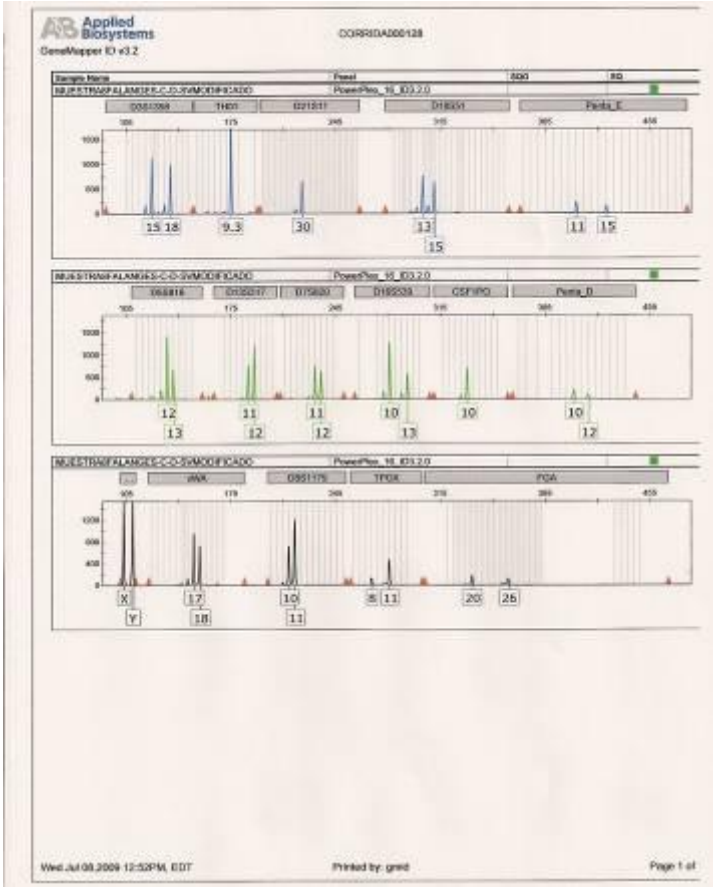


SV Total RNA Isolation System® – Modificado con desnaturalización



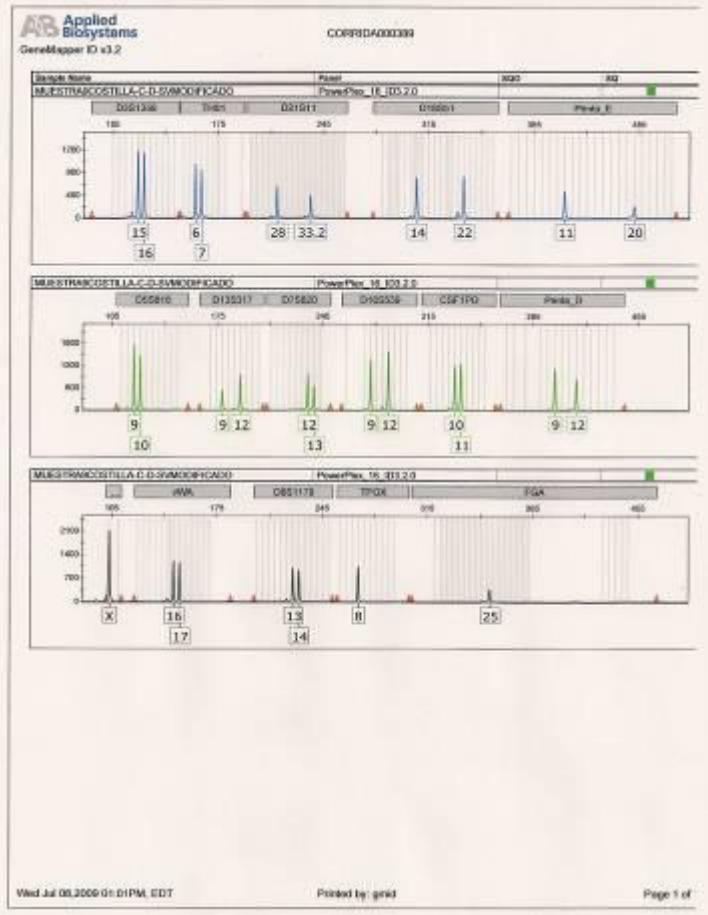
Muestra 8 (Falanges)

SV Total RNA Isolation System[®] – Modificado con desnaturalización



Muestra 9 (Costilla)

SV Total RNA Isolation System[®] – Modificado con desnaturalización



Muestra 10 (Fémur)

SV Total RNA Isolation System[®] – Modificado con desnaturalización

