

Análisis de DNA en restos óseos antiguos

Artículo de Revisión

DNA analysis in ancient skeletal remains

Dra. E. Alcalá-Espinoza

RESUMEN

La identificación humana a través del análisis de ADN de muestras óseas es un método científico de laboratorio al servicio de la investigación forense en nuestro entorno que cada día evoluciona gracias a importantes avances en el campo de la biología molecular y específicamente en su aplicación en el campo de la genética forense que permite nosotros hoy para abordar y resolver casos cada vez más complejos, relacionados con la identificación genética de restos humanos, cuyo proceso tiene pasos como la recolección y el procesamiento de las mejores muestras para obtener perfiles genéticos.

Palabras clave: restos esqueléticos, investigación forense, protocolo, perfil genético, mitocondrias.

SUMMARY

In our environment every day is evolving thanks to major advances in the field of molecular biology and specifically in its application in the field of forensic genetics that allow us today to address and resolve cases increasingly complex, related to genetic identification of human remains, which proc

Human identification through analysis of DNA from bone samples is a laboratory scientific method in the service of forensic investigation ess has steps as the collection and processing of best samples to obtain genetic profiles.

Keywords: Skeletal remains, forensic investigation, protocol, genetic profile, mitochondria.

Recibido: 15 Abril 2016; aceptado: 2 Mayo 2016; Publicado: 15 Agosto 2016
Bioquímica Forense, Instituto de Investigaciones Forenses, La Paz, Bolivia
Corresponding author: E. Alcalá-Espinoza, eliank_a@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La identificación humana a través del análisis del ADN a partir de muestras óseas es un método científico laboratorial al servicio de la investigación forense, que en nuestro medio cada día va evolucionando gracias a importantes avances en el campo de la Biología Molecular y en concreto en su aplicación en el campo de la Genética Forense que nos permiten en la actualidad abordar y resolver casos cada día más complejos, relacionados con la identificación genética en restos humanos, cuyo proceso tiene pasos como la recogida y tratamiento de las muestras más idóneas hasta la obtención de perfiles genéticos.

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Identificación Genética de Restos Cadavéricos

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

El laboratorio de Genética Forense utiliza un protocolo de identificación humana, en función a una mayor o menor complejidad de las muestras cadavéricas que se disponga para realizar la investigación, así como la disponibilidad de muestras de referencia para poder identificar los restos óseos, estas dos circunstancias permitirán decidir por una u otra estrategia de resolución, que puede clasificarse de acuerdo al caso primero en función del tipo de muestra que debemos analizar, segundo en función

del análisis comparativo y tercero en función del tipo de caso.



Figura 1. Identificación de material genético en piezas dentales

En función al tipo de la muestra:

- Restos cadavéricos en buen estado de conservación; la toma de muestra se realiza inmediatamente después de la muerte (sangre y/o músculo).
- Restos cadavéricos carbonizados; es posible obtener ADN de alta calidad de aquellos tejidos que no hayan sido destruidos, como dientes, diáfisis de huesos largos, musculo profundo, etc.
- Restos cadavéricos con un avanzado estado de putrefacción ó esqueletizados; las muestras más adecuadas son piezas dentales ó huesos largos.
- Restos cadavéricos momificados; una rápida evaporación del agua del cuerpo, permite preservar el material genético y su análisis.

En función al tipo de análisis genético comparativo:

- Identificación a través de una Identificación Biológica de

Paternidad directa o reversa: como muestras de referencia se utiliza a los hijos biológicos y progenitores.

- Dependiendo de los familiares que se disponga, se puede utilizar otras dos estrategias de estudio: como el análisis de ADN mitocondrial (línea materna) y ADN de cromosoma Y (línea paterna).

En función al tipo de caso.

Existe una enorme variedad de situaciones con las que nos podemos encontrar que dependerán de los antecedentes o circunstancias que han provocado la identificación:

- Identificación de personas desaparecidas, de forma accidental, en hechos criminales, víctimas de conflictos bélicos o políticos, desapariciones forzadas, etc.
- Identificación de personas víctimas de accidentes, como hechos de tráfico, domésticos, catástrofes, etc.

No es posible diferenciar si la muerte es accidental ó intencionada, así como es complejo conocer en ciertas situaciones las circunstancias que han motivado la muerte.

Análisis de DNA de restos antiguos

El análisis de este tipo de restos tiene un gran interés en el campo forense y son precisamente estas muestras las más utilizadas en estudios de restos antiguos. En el estudio de restos antiguos, el análisis de ADN nuclear se encuentra muy restringido, ya que la posibilidad de obtención de resultados es mínima como consecuencia de la degradación

del ADN, muchos estudios se basan en el ADN mitocondrial.

METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS

Tras la muerte, se activan los procesos autolíticos y de putrefacción cadavérica destructores de tejido blando, cuyas enzimas (nucleasas) producen el mayor daño al ADN; Las muestras recomendadas para el estudio genético que resisten mejor a los fenómenos de destrucción cadavérica y que conserva su estructura celular son los huesos y los dientes, debido a su estructura histológica que protege a sus componentes celulares, a nivel de los restos óseos existe una matriz orgánica calcificada impregnada de sales minerales, con una alta concentración de fibras de colágeno, que encierran las células óseas (osteocitos); Las células que componen el tejido óseo son los osteoblastos, que al rodearse de la matriz y madurar se denominan osteocitos y los osteoclastos; Los dientes, presentan una estructura conformado por una capa de esmalte y el cemento que protegen a la dentina que a su vez envuelve a la pulpa dentaria que tiene una alta concentración celular, la estructura dentaria también presenta otras células como los cementoblastos, cementocitos y odontoblastos.



Figura 2. Diáfisis de hueso largo

Estas son las razones por la que se recomienda realizar procedimientos de aislamiento de ADN a partir de restos óseos antiguos y en cadáveres putrefactos o carbonizados con muestras obtenidas en tejido óseo compacto que se halla en diáfisis de huesos largos y en piezas dentarias donde se conserva mejor el ADN

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos, es necesario previamente seguir varios procedimientos:

- Extracción del ADN: aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares
- Cuantificación del ADN: evaluar la presencia de ADN total y su estado de degradación en el extracto de ADN obtenido.
- Amplificación del ADN: Una vez extraído el ADN se procede a su análisis mediante técnicas de amplificación génica, que nos permitela obtención de grandes cantidades de las regiones específicas de ADN que interesa estudiar.
- Polimorfismos analizados: Los polimorfismos más utilizados son los STRs autosómicos y de cromosoma Y, ambos forman parte de ADN nuclear.

Los STRs son regiones de ADN repetitivo que se encuentran repartidas a lo largo del genoma, están compuestos por una secuencia de 2-7 pares de bases que se repite en tandem. Un gran número de estas regiones STR presenta un alto grado de polimorfismo genético de longitud cuya base molecular es la variación en el número de unidades de repetición. El alto grado de

polimorfismo de algunas de estas pequeñas regiones del genoma (100-400 pares de bases), constituye una de las razones fundamentales para ser utilizados por la genética forense.

Actualmente, se amplifican de 16 hasta 24 loci en la misma reacción, gracias al marcaje de uno de los primers en el extremo 5' con fluorocromos, lo que nos permite mezclar en la reacción de amplificación y caracterizar STRs que tengan el mismo tamaño, puesto que los que coinciden se marcan con fluorocromos que emiten a distinta longitud de onda y por tanto se detectan con un color distinto.

En cuanto a los STRs de cromosoma Y, en la actualidad se realiza una amplificación simultánea de 16 hasta 24 loci, con lo que se ha aumentado de una forma considerable el poder de discriminación de la técnica al contar con un número considerable de marcadores, son muy útiles en la resolución de casos en los que únicamente se dispone de parientes por vía paterna como muestras de referencia, debido a su herencia paterna. La determinación de sexo se realiza en todas las muestras que se analizan amplificando una corta secuencia del gen de la amelogenina que en el cromosoma X tiene una longitud de 106 pares de bases y en el cromosoma Y de 112 pares de bases.

El ADN mitocondrial: Muchos casos de identificación de restos cadavéricos sólo se pueden resolver con el análisis de fragmentos del genoma mitocondrial (regiones hipervariables I y II: HVI y HV2), esto se debe a que el ADN mitocondrial (ADNmt) es un genoma circular pequeño que, se encuentra en un gran número de copias y está más protegido de la acción destructiva de las nucleasas.

PROBLEMAS ASOCIADOS AL ANÁLISIS DE DNA

En restos antiguos el ADN presenta diferentes grados de alteración por degradación, contaminación o modificación, determinando durante su análisis cantidades pequeñas de ADN, así mismo los marcadores genéticos de mayor tamaño se amplificarán con menor eficiencia que los más pequeños, produciendo fenómenos de pérdidas de alelos que condicionan la fiabilidad de los resultados en estos marcadores y en las técnicas de amplificación génica.

Existen diferentes agentes que alteran al ADN como los medios físicos (radiación) entre ellas la radiación UV, los agentes oxidantes, la temperatura, humedad, el pH, los procesos mecánicos y las enzimas que pueden provenir del propio cadáver o de la flora bacteriana, los fenómenos de hidrólisis y las oxidaciones provocan roturas de enlaces, que conducen a la fragmentación de la cadena nucleotídica y por tanto a la degradación del ADN.

Un problema frecuente es la contaminación con ADN exógeno, humano o el procedente de la flora bacteriana que puede presentarse durante procesamiento de restos humanos antiguos, para ellos se sugiere

tomar todas las previsiones de bioseguridad durante el muestreo, traslado de las muestras y el análisis en laboratorio separando las áreas de trabajo dedicadas a: toma y preparación de muestras, extracción de ADN, amplificación génica y detección de los productos de amplificación.

La presencia de inhibidores de la polimerasa que no se consiguió eliminar en el proceso de extracción pueden repercutir negativamente en la obtención de resultados de amplificación; durante la extracción de ADN en muestras de restos antiguos es frecuente la extracción paralela de inhibidores que acompaña al ADN buscado, considerando que el colágeno tipo I, los residuos de porfirinas, algunos componentes del suelo (ácido húmico y fórmico) actúan como inhibidores de la polimerasa.

La inhibición puede controlarse con ensayos preliminares con el fin de descubrir al inhibidor y dirigir medidas para descartarlas como: el aumento de la cantidad de polimerasa en la reacción de amplificación, volver a extraer la muestra cambiando el método de extracción, o diluir el extracto de ADN para disolver el inhibidor sin modificar a la polimerasa.

criminal y la paternidad biológica. *Ciencia Forense*, 4(5): 269-74.

REFERENCIAS

Alonso A, Martín P, Albarrán C et al (2003). Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J*, 44(3): 273-80.

Lorente J, Lorente M (2011). El ADN y la identificación en la investigación

Estudio de polimorfismo de ADN entre restos antiguos (2015). Universidad de Madrid. Tomado de www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26242pdf.

Hochmeister MN (2013). Confirmation of the identity of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and typing kits, *Journal of Forensic Sciences*, 40: 701-705.

Prieto L, León A, García E (2015). Comparación de distintos métodos de extracción de ADN en restos óseos para análisis de STRs vía PCR, Ciencia Forense, 5: 1-12.

Rothhammer F, Moraga M, Rivera M (2014). Análisis de ADN mt de restos esqueléticos del sitio arqueológico de Tiwanaku y su relación con el origen de sus constructores. Colombia Forense, 5(4): 1-9.



**Revista Mexicana de Medicina Forense
y Ciencias de la Salud**