

# **Optimización de la recuperación de ADN antiguo a partir de restos óseos humanos: aplicaciones forenses en el contexto de la Memoria Histórica**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Angélica García Díez**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Máster en Genética, Física y Química Forense**

**Tutor URV: Ximena Terra Barbadora**

**Facultad de Química**

**Junio 2025**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Memoria Histórica</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Factores que influyen en la integridad de la muestra</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Selección de la muestra ósea idónea</b> .....	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Objetivo general</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>7</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1 Selección de pieza</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1.1 Huesos largos</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1.2 Dientes</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.3 Hueso petroso</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1.4 Huesos pequeños y esponjosos</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.5 Otros huesos</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.6 Discusión selección de pieza</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2 Limpieza y pre-tratamiento</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.1 Limpieza</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.2 Pulverización</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.3 Desmineralización</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.4 Separación por densidad</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.5 Discusión limpieza y pre-tratamiento</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Métodos de extracción</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.1 Extracción orgánica</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.2 Extracción con sílice</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3.3 Extracción con perlas magnéticas</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.4 Discusión métodos de extracción</b> .....	<b>25</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>27</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>29</b>

## **RESUMEN**

A partir de la década de 1980, la genética forense ha cobrado un papel fundamental dentro del sistema judicial, convirtiéndose en una herramienta indispensable para la resolución de crímenes y disputas, tanto en el ámbito civil como penal. En el contexto de la Memoria Histórica, para lograr la identificación de restos óseos de varias décadas de antigüedad mediante el análisis de su material genético, varios factores deben ser tomados en cuenta. Las condiciones ambientales a las que ha sido expuesto cada uno de los restos, además del paso del tiempo, provocan la degradación del ADN presente en las muestras, complicando la obtención de perfiles genéticos aptos para lograr una identificación. En este estudio se ha analizado la información presente en la bibliografía, con el fin de identificar el mejor método que maximice la cantidad de ADN extraída a partir de los restos y por tanto facilite el análisis del material genético. Así, la selección de la *pars petrosa* como pieza de análisis, seguida de una desinfección mediante la eliminación de la superficie externa, pulverización, desmineralización y finalmente extracción mediante perlas paramagnéticas, parece ser el método idóneo para la obtención de suficiente ADN de calidad.

## **ABSTRACT**

Since the 1980s, forensic genetics has taken on a fundamental role within the judicial system, becoming an indispensable tool for resolving crimes and disputes, both in civil and criminal matters. Relating to Historical Memory, several factors must be taken into account in order to identify skeletal remains that are several decades old through the analysis of their genetic material. The environmental conditions to which each of the remains has been exposed, in addition to the passage of time, cause the samples' DNA to degrade, making it difficult to obtain genetic profiles suitable for identification. This study has analysed the information available in the literature to identify the best method which maximizes the amount of DNA extracted from the remains, and thus facilitates the analysis of the genetic material. Thus, selecting the *pars petrosa* as the specimen for analysis, followed by disinfection by removing the external surface, pulverization, demineralization, and finally extraction using paramagnetic beads, appears to be the ideal method for obtaining sufficient quality DNA.

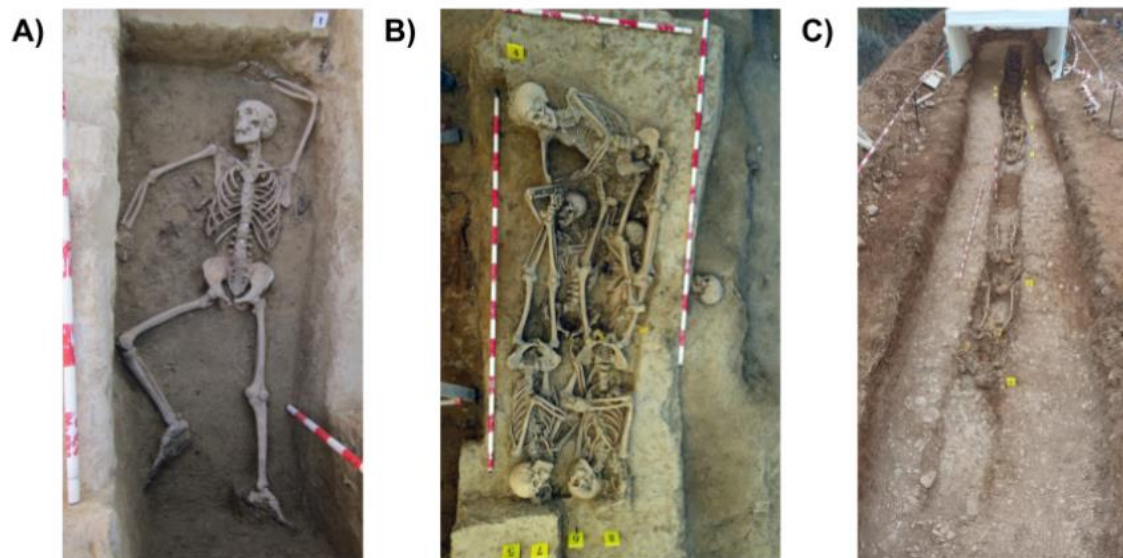
## **1. INTRODUCCIÓN**

La identificación de individuos de forma precisa e inequívoca ha sido un gran desafío abordado desde muchas perspectivas a lo largo de la historia. Desde las tradicionales antropometría (estudio de las características físicas) y dactiloscopia (estudio de las impresiones dactilares), hasta las técnicas más innovadoras como el reconocimiento facial y el análisis de imágenes del iris. Todas ellas han intentado encontrar una característica única, propia de cada ser humano, que sea capaz de diferenciarlo con la mayor sencillez y en el menor tiempo posible para resolver cuestiones legales, familiares, médicas, humanitarias e históricas. Y aunque es cierto que la combinación de algunas de estas técnicas es necesaria, no hay duda de que una de ellas ha supuesto un gran hito en este campo. Se trata de la identificación por medio del ácido desoxirribonucleico (ADN), que se ocupa del estudio e investigación de la información genética para la identificación de personas. Sus resultados son utilizados posteriormente por el sistema legal para realizar las interpretaciones necesarias en la investigación de crímenes, casos civiles e históricos y catástrofes. Entre las principales características de las técnicas para análisis de ADN utilizadas por la ciencia forense se pueden citar la precisión, la confiabilidad, la objetividad, el poder de discriminación y la aplicabilidad. Adjetivos que permiten dilucidar la importancia que estas técnicas han ido cobrando desde su aparición, ya en el año 1900 con el descubrimiento del primer polimorfismo en las proteínas de los grupos sanguíneos humanos; y el primer uso de perfiles de ADN, para la identificación de un sospechoso en el año 1986. En la actualidad, se ha logrado tal avance en estas técnicas hasta el punto de ser posible la identificación de un sujeto a partir de la cantidad más pequeña de muestra (como sangre, cabello, tejido, huesos, semen) extrayendo información de gran valor que, de otro modo, habría llevado meses, años o nunca se hubiese llegado a obtener (Nizami et al., 2018; Jobling & Gill, 2004).

## 1.1 Memoria Histórica

La genética forense ha emergido como una de las herramientas fundamentales en la búsqueda de la verdad, la justicia y el recuerdo en el contexto de la Memoria Histórica. Su aplicación en la exhumación e identificación de víctimas de crímenes del pasado, como guerras civiles, dictaduras y regímenes totalitarios, ha permitido dar un nombre y una historia a miles de personas que fueron desaparecidas o enterradas en fosas comunes.

En los últimos años, la frase “memoria histórica” ha llegado a convertirse en España en sinónimo del deber cívico de recordar la represión llevada a cabo en la Guerra Civil y la inmediata posguerra (Labanyi, 2006). Son numerosas las asociaciones y organismos que han ido surgiendo para reivindicar este deber y gestionar las acciones necesarias para su realización, llevando a cabo exhumaciones en toda la geografía española e interviniendo en 777 fosas comunes (Fig.1) siendo capaces de recuperar 9552 esqueletos desde el año 2000 (Etxeberria, 2020).



**Figura 1:** Fosas Comunes. **A)** Esqueleto de la Fosa 1 de Gurrea de Gállego (Huesca, Aragón, España). **B)** Fosa 2 de Gurrea de Gállego (Huesca, Aragón, España). **C)** Fosa de Castiliscar (Zaragoza, Aragón, España). (Ruiz, 2017).

Así, para la búsqueda de los desaparecidos se siguen cuatro etapas fundamentales: la investigación preliminar, la intervención de las ciencias forenses, el acompañamiento del regreso de los restos mortales con sus familias y la sociedad y, finalmente, la interpretación histórica y social de los hechos investigados (Bolaños, 2010).

A su vez, la intervención de las diferentes ciencias forenses se basa en la exhumación y recuperación de los restos de las fosas donde se encuentran enterrados, trabajo propio de la arqueología y medicina forense; el análisis de ADN, normalmente a partir de restos óseos como huesos y dientes para la obtención de la información genética del individuo, realizada por la genética forense; y la comparación de estos perfiles con los de sus supuestos familiares mediante la estadística forense para confirmar la identificación de la víctima o su relación de paternidad o maternidad.

## **1.2 Factores que influyen en la integridad de la muestra**

En el contexto de la Memoria Histórica, las principales muestras disponibles son restos óseos con una antigüedad de a menudo décadas. Durante este prolongado lapso de tiempo entre el fallecimiento del individuo y el análisis del resto, el hueso se ve expuesto a todo tipo de factores ambientales como el pH de la tierra donde se encuentra enterrado, humedad, temperatura, radiación ultravioleta u otros procesos diagenéticos tales como la degradación por microorganismos, pérdida de elementos orgánicos y cambios minerales (Kendall et al., 2018). Todos estos factores comprometen la integridad del ADN, convirtiendo al proceso de extracción en uno de los pasos clave para el éxito final del análisis genético. Por ello, todos los esfuerzos se basan en la optimización del procedimiento secuencial constituido por disgregación de la matriz, lisis de membranas celulares, purificación, concentración del material genético y elución final, permitiendo recuperar la máxima cantidad en las mejores condiciones posibles (Crespillo Marquez & Barrio Caballero, 2019).

### **1.3 Selección de la muestra ósea idónea**

Un cuerpo humano adulto contiene más de 200 huesos divididos en dos grandes grupos: el esqueleto axial (formado por cráneo, columna vertebral, costillas y esternón) y el esqueleto apendicular (que incluye las extremidades y huesos de la cintura). En el contexto de la Memoria Histórica, cada uno de estos huesos puede encontrarse, con mayor o menor frecuencia, al exhumar o desenterrar los restos que se encuentran presentes en las fosas (*Atlas del cuerpo humano - Esqueleto*, 2007).

En vista de esta gran diversidad ósea, la selección de una muestra de partida adecuada para realizar los análisis genéticos adquiere una importancia crucial. Debido a las diferentes características intrínsecas de cada hueso, como la porosidad, densidad ósea, longitud y posición en el cuerpo, a la variabilidad inter e intraindividuo y también a los factores ambientales ya comentados, el ADN no se conserva de igual forma en todos ellos (Campos et al., 2012).

En la selección de la muestra ósea más adecuada, no se puede obviar el enorme componente emocional que tienen los resultados de análisis genéticos para casos relacionados con la Memoria Histórica. La entrega de los restos a los familiares del fallecido es, probablemente, más significativo que el valor de evidencia genética que se les pueda aportar junto con ellos. Por ello, y como ejemplo, es normal utilizar como último recurso huesos del cráneo, aun teniendo evidencia de su buen desempeño en el análisis, únicamente por el significado que pueda tener su entrega a los familiares (Bolaños, 2010).

Debido a todas estas limitaciones presentes en el análisis rutinario de restos óseos en el contexto de la Memoria Histórica, la búsqueda de un método de extracción que permita obtener la máxima cantidad de ADN de calidad, evitando la alteración de las muestras y con la mayor rapidez y eficiencia, es actualmente uno de los grandes objetivos de la genética forense.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Esta revisión bibliográfica tiene como finalidad analizar y sintetizar la información disponible sobre los métodos empleados en la extracción de ADN a partir de restos óseos humanos, en el contexto de estudios antropológicos y de Memoria Histórica, con el fin de optimizar la recuperación de material genético útil en situaciones de alta degradación y reducida cantidad.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar las piezas óseas del esqueleto humano que presentan una mejor preservación del ADN, siendo las más adecuadas para su utilización como fuente.
- Revisar los métodos más eficaces de desinfección y pre-tratamiento de restos óseos humanos que maximicen la calidad del material genético obtenido.
- Comparar los principales protocolos de extracción de ADN en términos de eficiencia, rendimiento y preservación de la integridad genética.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Selección de pieza**

Como se ha mencionado previamente, el ADN no se conserva de igual forma en las diferentes partes del esqueleto. Por ello, es crucial conocer la estructura y características de cada uno de los huesos que se utilizan para la extracción, permitiendo maximizar la cantidad de ADN y, por consiguiente, la calidad de los perfiles obtenidos.

En este apartado se analizarán los resultados obtenidos en estudios realizados a partir de restos óseos antiguos de diferentes piezas del esqueleto humano, entre las que se encuentran: huesos largos, como el fémur o la tibia, muy utilizados en el análisis forense actual; dientes, también analizados de forma preferente en estudios antropológicos; el hueso petroso, una de las piezas más prometedoras; y posibles alternativas para las que todavía es necesaria mucha investigación, como los huesos pequeños y esponjosos.

##### ***3.1.1 Huesos largos***

Según las recomendaciones actuales para el muestreo de estructuras forenses, los restos más adecuados para obtener y analizar ADN de los esqueletos son los huesos compactos, particularmente los largos, como el fémur y la tibia (Mundorff & Davoren, 2014).

El principal motivo del éxito de la recuperación de ADN a partir del fémur y la tibia, se debe a su capacidad para soportar peso, lo que da como resultado una corteza más densa en comparación con los huesos del esqueleto axial o la extremidad superior, ayudando a proteger mejor el ADN de la degradación ambiental. De hecho, se considera que la diáfisis media del fémur es la zona con mayor densidad ósea de todo el cuerpo humano (Stan et al., 2024).

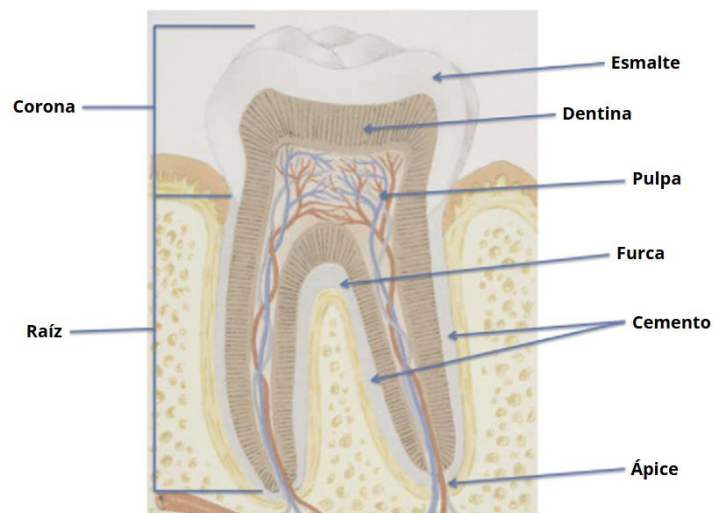
Hasta la fecha varios estudios han demostrado que tanto el fémur como la tibia proporcionan cantidades suficientes de ADN para obtener perfiles de repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeats* o STR's) con éxito, produciendo aproximadamente la misma cantidad de ADN dentro de un mismo individuo. Sin embargo, algunos estudios indican que el fémur puede proporcionar rendimientos de ADN más bajos en comparación con otros huesos (Hasap et al., 2020) y que la tibia presenta variabilidad en

la cantidad de ADN obtenido haciendo dudar sobre su consistencia como fuente de extracción (Haarkötter et al., 2023).

Finalmente, en contextos antropológicos, los huesos largos se encuentran ausentes aproximadamente en el 50% de los casos, estando entre un 15% a 20% de ellos, fragmentados, reduciendo su disponibilidad para un posible análisis (Haarkötter et al., 2023).

### 3.1.2 Dientes

Como ya se ha comentado con anterioridad, tradicionalmente se ha establecido que la materia cortical de los huesos largos y los dientes intactos (especialmente molares y premolares) tienen una mayor tasa de éxito en los análisis de ADN (Haarkötter et al., 2023). Anatómicamente, los dientes humanos se dividen en dos partes: la corona, que está expuesta en la boca, y las raíces, que se encuentran dentro de los maxilares. Las raíces dentales incluyen al cemento y la dentina, ambos tejidos mineralizados y altamente celulares. La corona, por su parte, está principalmente formada por el esmalte, un tejido altamente mineralizado y acelular que recubre todo el diente (Fig. 2). En el caso de las piezas dentales, la preservación del ADN se da gracias al esmalte dental que proporciona una barrera física frente a condiciones externas como luz UV, humedad, calor y microorganismos (Higgins & Austin, 2013).



**Figura 2:** Estructura del diente. La imagen ilustrada muestra un molar mandibular humano seccionado de forma longitudinal (Higgins & Austin, 2013).

Se ha demostrado que las raíces dentales, que además incluyen la pulpa (tejido blando que contiene a los nervios, vasos sanguíneos y tejido conectivo), producen más ADN que la corona (Fig.2) (Vinueza-Espinosa et al., 2020). Incluso en dientes sin pulpa, la cantidad de ADN obtenida de la dentina es diez veces mayor que la del cemento (Gaytmenn & Sweet, 2003). Por este motivo dientes con pulpas más grandes y varias raíces se consideran las mejores fuentes de ADN, así, las muelas serían los dientes más adecuados para la extracción de ADN, ya que poseen pulpas más grandes y varias raíces (Heathfield et al., 2021; Stan et al., 2024). En ausencia de molares, los premolares tendrían más cemento celular y por lo tanto una mayor posibilidad de conservación, pero los caninos tendrían un volumen pulpar mayor (Higgins & Austin, 2013).

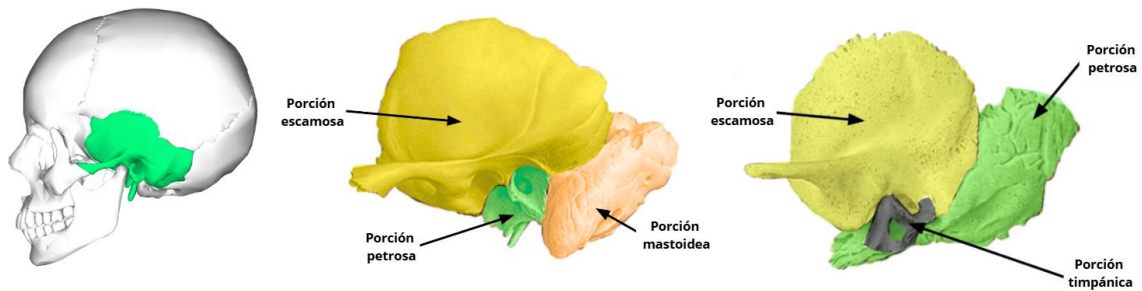
Cabe destacar, que aunque los dientes se consideren una fuente de ADN óptima, no siempre están disponibles para su análisis, perdiendo su valor antropológico si no se encuentran incrustados en la mandíbula del individuo (Edson, 2019).

### **3.1.3 Hueso petroso**

En los últimos años, el hueso petroso, peñasco o *pars petrosa*, ha emergido como una de las fuentes más valiosas para la extracción de ADN a partir de restos antiguos (Stan et al., 2024), obteniendo, en algunos estudios, rendimientos de ADN endógeno que superan a los de los dientes entre 4 y 16 veces (con media de 5,2), y a los de otros huesos hasta 183 veces (Gamba et al., 2014).

El hueso petroso se sitúa en la base del cráneo, entre los huesos esfenoides y occipital, constituyendo la parte intracraneal del hueso temporal (Pilli et al., 2018) (Fig. 3). Es el hueso más resistente del cuerpo de los mamíferos y protege los órganos de la audición y el equilibrio conocidos colectivamente como el órgano vestíbulo-coclear (Hansen et al., 2017). Esta protección resulta en una mayor conservación del ADN en su interior en comparación con otras piezas de interés forense (Vinueza-Espinosa et al., 2020). Además, posee tres veces más de osteocitos (células del hueso) que el fémur, lo que deriva en una mayor cantidad de ADN por pieza (Haarkötter et al., 2023). Las cavidades internas interconectadas del hueso petroso conforman la cápsula ótica del oído interno, formada por la cóclea, el vestíbulo y tres canales semicirculares (Fernandes et al., 2023). En

concreto, Stan et al. (2024) observaron una concentración de ADN significativamente mayor en la cóclea, siendo la parte ósea densa del peñasco fuera de la cápsula ótica, la que presentó la menor concentración (6 veces menor que la cóclea). Resultados similares obtuvieron Pinhasi et al. (2015), donde los rendimientos del interior de la cápsula ótica superaron al exterior hasta en 65 veces.



**Figura 3:** Localización del hueso petroso.

La mayoría de los autores coinciden en que al comparar la cantidad de ADN extraído y la calidad de los perfiles de STR's obtenidos de dicho ADN a partir del hueso petroso y otras piezas del esqueleto, la *pars petrosa* supera a todos los demás, por esta razón, si estuviera disponible, siempre debería preferirse para las pruebas genéticas (Di Stefano et al., 2024; Vinueza-Espinosa et al., 2020; Pilli et al., 2018). Un ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo por Haarkötter et al. (2023), en el que se compararon los sustratos óseos clásicos (dientes, fémur y tibia) con el peñasco, obteniendo para este una cantidad de ADN entre 15 y 30 veces más que para el resto de huesos. Además, el hueso petroso tuvo los datos de RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia) más altos, con un promedio de 5278, seguido por el diente (2278), la tibia (1252) y el fémur (744).

A pesar de los excelentes resultados obtenidos a partir del hueso petroso y su frecuente aparición en contextos antropológicos (faltando solamente en el 15% de los casos (Haarkötter et al., 2023; Kulstein et al., 2018)), la mayor dificultad para su uso es su extracción a partir de un cráneo intacto (Edson, 2019; Charlton et al., 2020). Tradicionalmente, este proceso implicaba seccionar o pulir el hueso temporal para aislar la cóclea (Parker et al., 2020), lo que puede dañar los puntos de referencia antropológicos. Sin embargo, Pilli et al. (2018), desarrollaron un método para extraer el petroso sin alterar la integridad del cráneo, cortando con un bisturí quirúrgico y dejando un pequeño orificio visible solo desde la vista basal.

### ***3.1.4 Huesos pequeños y esponjosos***

Estudios recientes informan de la gran cantidad de ADN de alta calidad que se puede extraer a partir de los pequeños huesos esponjosos de las manos y los pies (Otagiri et al., 2024; Harrel & Hughes-Stamm, 2020).

La comparación de los rendimientos de ADN de muestras dentro de un individuo llevada a cabo por Mundorff et al. (2009), reveló que los huesos esponjosos pequeños, como el carpo, metacarpiano, tarso, metatarsiano y falanges proximales, tienen en promedio cantidades mucho mayores de ADN por unidad de masa que los huesos corticales densos. Una posible explicación es que los huesos esponjosos contienen más células, nervios y vasos sanguíneos, así como menos calcio (Hasap et al., 2020).

Concretamente, la primera falange distal de la mano y el capitato (el mayor de los huesos carpianos situado en el centro de la muñeca), parecen ser los que mejores resultados aportan, obteniendo tres veces más de concentración de ADN que algunos huesos tradicionales como la tibia o el fémur (Hasap et al., 2020).

Además, su pequeño tamaño y facilidad de manipulación durante el muestreo y el pre-procesamiento con solo un bisturí desechable (Mundorff & Davoren, 2014), puede prevenir la contaminación por ADN exógeno, lo que permite a los analistas reducir el tiempo y el costo experimental (Otagiri et al., 2024; Golob et al., 2024).

### ***3.1.5 Otros huesos***

Otros huesos, como las costillas y las vértebras han demostrado ser las más adecuadas en esqueletos incompletos donde solo se dispone de restos del torso. Entre las costillas, la que mayor rango de ADN parece poseer es la primera costilla, y entre las vértebras, las torácicas proporcionan el mayor rendimiento. Aunque las vértebras y las costillas se encuentran entre los tipos de huesos más propensos a la descomposición, los resultados de numerosos estudios muestran que son útiles para la identificación de los restos generando perfiles genéticos completos de hasta el 86% de las muestras en algunos casos (Božič et al., 2022; Harrel & Hughes-Stamm, 2020; Di Stefano et al., 2024).

El calcáneo y el astrágalo (huesos que forman la articulación subastragalina del pie) son los huesos esponjosos más grandes. Son más propensos a descomponerse debido a su

pequeño tamaño y gran porosidad, pero se conservan incluso en esqueletos antiguos. De hecho, algunos estudios como el realizado por Golob et al. (2024), demostraron que el calcáneo puede llegar a superar al hueso petroso.

Finalmente, la rótula, hueso sesamoideo (tipo de hueso formado por capas delgadas y compactas intercaladas con regiones de hueso esponjoso) de la parte frontal de la rodilla, se clasifica como uno de los elementos esqueléticos que, en varios estudios, ha mostrado ser una fuente valiosa para la obtención de ADN (Finaughty et al., 2023), llegando a obtener perfiles de STR's con una tasa de éxito superior a 80% en algunos de ellos (Geršak et al., 2025; Mundorff et al., 2009).

### ***3.1.6 Discusión selección de pieza***

Tradicionalmente se consideraba que el ADN tiende a degradarse menos en las partes más densas del esqueleto, concretamente en aquellas que soportan peso como el fémur o la tibia o con una gran protección como los dientes. Sin embargo, numerosos estudios indican que otras piezas del esqueleto como el hueso petroso y huesos de tipo esponjoso son capaces de conservar el ADN con la misma o incluso mejor eficacia (Mundorff, 2019).

El principal motivo para el uso de los huesos largos como matriz para extraer el ADN es su densidad cortical, que proporciona una gran resistencia y protección del material genético. Con un muestreo relativamente fácil y una aparición en enterramientos normalmente habitual, la tibia y el fémur se convirtieron en algunos de los huesos preferentes para el análisis genético, proporcionando resultados lo suficientemente correctos para la identificación de un gran número de individuos en diversos estudios a lo largo de los años. Siguiendo una línea similar, y siendo también piezas preferentes para el análisis, se sitúan las piezas dentales, en este caso, su resistencia y protección al ADN proviene del esmalte, y al igual que los huesos largos, se suelen encontrar con facilidad en los enterramientos proporcionando además un muestreo sencillo. En este caso, con un rendimiento más alto de ADN, conviene seleccionar los premolares y caninos, ya que poseen una gran cantidad de cemento protector y además un mayor volumen pulpar, lo que se traduce en una mayor cantidad de material genético. Sin embargo, la mayor

limitación para los dientes y huesos largos es la gran velocidad a la que se degradan en caso de fragmentarse o poseer enfermedades, además de, en el caso de los dientes, la necesidad de retención de la pieza dentro de la mandíbula, situaciones que, con frecuencia, dificultan su uso en el análisis de ADN forense (Tabla 1).

Con el objetivo de superar este tipo de limitaciones, numerosas investigaciones han estudiado de forma sistemática varias piezas del esqueleto, aspirando a encontrar aquellas que proporcionen mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad de ADN extraído o, al menos, que igualen a las utilizadas tradicionalmente en caso de no estar disponibles. Así se ha comprobado cómo, al contrario de lo que se suponía, huesos esponjosos y pequeños como los de las manos, pueden producir cantidades de ADN de suficiente calidad comparables con aquellos más densos y largos, convirtiéndose en una opción altamente viable para el análisis forense. Además, su facilidad de muestreo en caso de estar presentes (lo están en menor frecuencia que el resto) hace que sean una alternativa eficiente que se debería profundizar. Por su parte, las costillas y vértebras, también huesos esponjosos, son de gran utilidad en caso de no disponer de las extremidades, ya que, apareciendo con relativa alta frecuencia en los enterramientos, también son capaces de proporcionar perfiles genéticos completos a pesar de ser altamente propensos a la degradación. En esta línea, también el hueso de la rótula, hueso sesamoideo con regiones esponjosas, ha mostrado prometedores resultados en estudios recientes, pudiendo convertirse en un candidato más si es investigado con mayor profundidad (Tabla 1).

Finalmente, con los mayores rendimientos de ADN y por tanto, siendo las piezas que más interés suscitan para la extracción de material genético en el ámbito forense, se encuentran el hueso petroso y el calcáneo. La *pars petrosa* ha superado considerablemente las cantidades de ADN y calidad de los perfiles obtenidos comparados con los demás restos óseos obtenidos. Con una frecuencia de aparición en los enterramientos extremadamente alta y una muy buena conservación debida a la gran resistencia del hueso, únicamente su dificultad a la hora de realizar el muestreo presenta una limitación. Sin embargo, este obstáculo ya se está viendo solucionado en diversos estudios con el desarrollo de protocolos que permiten extraer este hueso sin alterar ni destruir el cráneo, convirtiendo a esta pieza en una fuente extremadamente valiosa para la extracción de ADN en contextos forenses. Por último el calcáneo, hueso esponjoso del pie, también ha demostrado su gran utilidad para la extracción de material genético, superando en algunos

casos al hueso petroso. Su fácil muestreo, alta frecuencia de aparición en enterramientos y buena conservación, hacen que en un futuro y con más investigación, pueda convertirse también en una de las piezas preferentes para el análisis de ADN en restos humanos (Tabla 1).

**Tabla 1:** Comparación tipos de hueso.

<b>Tipo de Hueso</b>	<b>Rendimiento de ADN</b>	<b>Estructura</b>	<b>Frecuencia en enterramientos</b>	<b>Muestreo</b>	<b>Consideraciones adicionales</b>
<b>Huesos largos (fémur y tibia)</b>	Medio variable	Alta densidad cortical	Variable Fragmentados con frecuencia	Relativamente fácil	Preferencia de análisis tradicionalmente
<b>Dientes</b>	Alto variable	Protección de esmalte	Variable	Fácil	Preferencia de análisis tradicionalmente
	Mejor en premolares y caninos	Retención en el alveolo	Buena conservación		
<b>Hueso petroso</b>	Alto	Alta densidad Alta presencia de osteocitos	Alta Buena conservación	Complejo	Posible destrucción del cráneo durante el análisis
<b>Huesos pequeños y esponjosos</b>	Medio alto	Bajo contenido en calcio Alta celularidad	Media	Fácil	Poca investigación
<b>Costillas y vértebras</b>	Medio Similar para vértebras torácicas y primeras costillas	Alta porosidad	Media alta Alta degradación	Fácil	Útiles en ausencia de extremidades
<b>Calcáneo y astrágalo</b>	Alto	Alta porosidad Alta celularidad	Alta Buena conservación	Relativamente fácil	Poca investigación

## **3.2 Limpieza y pre-tratamiento**

Para lograr una extracción de ADN exitosa, varios pasos de pre-tratamiento son necesarios. Normalmente, el procesamiento tradicional de los restos incluye su descontaminación, pulverización y desmineralización. Dentro de esta sucesión de tratamientos, existen numerosas variantes y nuevas metodologías, todas ellas con el objetivo de mejorar el rendimiento y la calidad del ADN recuperado de los tejidos esqueléticos.

### ***3.2.1 Limpieza***

Un aspecto de gran importancia al trabajar con ADN humano de restos óseos es la posibilidad de contaminación. Numerosos estudios han demostrado la existencia de contaminación con ADN exógeno en análisis forenses ya sea en el ámbito criminal como en la investigación de ADN antiguo. El mayor problema de esta contaminación es que el ADN exógeno suele encontrarse dañado en menor proporción y mayor cantidad que el ADN endógeno de interés, pudiendo resultar en perfiles de ADN erróneos (Higgins & Austin, 2013).

Para solucionar esta cuestión, los investigadores forenses utilizan diversos métodos que pretenden eliminar la contaminación antes de comenzar con la extracción de ADN endógeno (Kemp & Smith, 2005), algunos de estos son la inmersión en hipoclorito de sodio (lejía), la exposición a luz ultravioleta y la eliminación física de la superficie externa. Todos ellos presuponen que la contaminación únicamente se encuentra en las superficies más externas (Higgins & Austin, 2013).

#### ***3.2.1.A Inmersión en hipoclorito de sodio (lejía)***

El método de descontaminación más frecuente es el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl o lejía). Este compuesto, elimina el ADN exógeno gracias a sus propiedades oxidativas y clorantes que provocan la rotura del ADN en fragmentos cada vez más pequeños (Kemp & Smith, 2005). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que el ADN contaminante no se elimina, sino que se degrada, dificultando su distinción del ADN endógeno de interés (Higgins & Austin, 2013).

Aun así, son numerosos los estudios que defienden la desinfección de los restos óseos mediante hipoclorito de sodio, ya que, además de eliminar el ADN exógeno, es capaz de suprimir algunos inhibidores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Koehn et al., 2020). Además, otras investigaciones, como la llevada a cabo por Kemp & Smith (2005) afirman que, aplicado correctamente, es un medio eficaz para destruir la contaminación de las superficies óseas, eliminando en algunos casos entre el 81 y el 99% del ADN exógeno (Barta et al., 2013).

### *3.2.1.B Exposición a luz ultravioleta*

La descontaminación por exposición a luz ultravioleta (UV) es un método altamente utilizado para la desinfección de superficies y materiales de uso forense. Sin embargo, también es capaz de eliminar el ADN exógeno de la superficie de muestras óseas (Harrel & Hughes-Stamm, 2020). La luz ultravioleta, especialmente en el rango UVC (Radiación Ultravioleta de Onda Corta: 200-280 nm), posee una alta energía que es absorbida por el ADN. Esta absorción conduce a la formación de dímeros de pirimidina y otros productos que fragmentan las moléculas de ADN (Markovitsi, 2016).

Cabe destacar, que la exposición prolongada de las muestras a la luz UV puede causar daño en el ADN endógeno, especialmente si las muestras son muy finas o porosas por lo que todavía falta investigación para conocer el tiempo de exposición exacto necesario (Vanek et al., 2009; Higgins & Austin, 2013).

### *3.2.1.C Eliminación física de la superficie externa*

Finalmente, la eliminación física de la superficie externa del diente o del hueso mediante el lijado o la abrasión, también es un método de descontaminación muy utilizado. Este método mecánico, normalmente se realiza antes de la pulverización del hueso y utiliza papel de lija o herramientas especializadas (Harrel & Hughes-Stamm, 2020).

El mayor inconveniente de este método es la generación de calor que puede afectar al ADN endógeno reduciendo su cantidad y calidad, por ello, es recomendable su realización de forma manual o a velocidades bajas (Corrêa et al., 2021). Además, puede generar la dispersión de partículas finas de polvo que produzcan contaminación cruzada.

### **3.2.2 Pulverización**

El método más utilizado para la preparación de muestras en el análisis forense de restos óseos es la pulverización del hueso (Corrêa et al., 2021). Ésta técnica consiste en moler las piezas óseas o dientes hasta obtener un polvo fino con el propósito de aumentar la superficie efectiva para facilitar la lisis de las células en la extracción del ADN (Harrel & Hughes-Stamm, 2020).

La pulverización se puede llevar a cabo con la utilización de diferentes instrumentos, incluyendo el uso de morteros manuales, licuadoras, molinos de congelación (“*Freezer Mills*”) o molinos de bolas, siendo el *Freezer Mill* el más utilizado por los laboratorios forenses (Loreille et al., 2007; Harrel & Hughes-Stamm, 2020). Aun así, al comparar los resultados obtenidos del análisis realizado utilizando los cuatro métodos, el *Freezer Mill* y las licuadoras parecen obtener resultados semejantes siendo los beneficios de un método sobre otro, mínimos (Loreille et al., 2007).

Pese a ser el pre-tratamiento utilizado en la mayoría de laboratorios forenses, la pulverización de los restos posee varias limitaciones a tener en cuenta, ya que puede aumentar el riesgo de contaminación y genera calor, dañando el ADN de las muestras (Higgins & Austin, 2013). Por estos motivos, los protocolos utilizados requieren de instrumentación específica en condiciones controladas (como el uso de trituradores criogénicos y nitrógeno líquido) (Corrêa et al., 2021). Con el objetivo de evitar este paso de pulverización, numerosos estudios han propuesto prometedoras metodologías como la desmineralización total.

### **3.2.3 Desmineralización**

Gran parte de los protocolos actuales para el análisis de ADN a partir de restos antiguos y dientes utilizados en laboratorios forenses incluyen el paso de desmineralización o decalcificación como parte de su pre-tratamiento. Este proceso se basa en la incubación de la muestra molida en un tampón o buffer con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Loreille et al., 2007). El EDTA es capaz de disolver la matriz mineral (agregados cristalinos a los que el ADN se encuentra unido) mediante la quelación de cationes de calcio, ayudando así a la digestión enzimática de la matriz orgánica y a la liberación del ADN (Higgins & Austin, 2013; Harrel et al., 2018).

A pesar de que el proceso de desmineralización total es considerado uno de los mejores métodos para el tratamiento de restos humanos degradados (Finaughty et al., 2023; Haarkötter et al., 2023), los investigadores siguen estudiando cómo mejorar algunos de sus inconvenientes. Normalmente, el protocolo finaliza descartando el EDTA, acción que se cree, conduce a la pérdida de ADN endógeno (Corrêa et al., 2021). Además, incluso si el sobrenadante que contiene el EDTA se utiliza para el análisis, el polvo sin disolver, que contiene ADN sin extraer, también es desechado al final del protocolo (Loreille et al., 2007). Para solucionar esta pérdida, Loreille et al. (2007) han desarrollado una metodología donde el polvo de hueso se disuelve completamente y el EDTA forma parte del buffer de lisis, lo que resulta en la obtención de entre 2,5 y 100 veces más de ADN.

Asimismo, la mayoría de los métodos que evitan la pulverización del resto se basan en el proceso de desmineralización. Ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo por Harrel et al. (2018) donde se aplica la decalcificación directamente sobre pequeñas secciones de hueso. Cabe destacar que los resultados no son especialmente prometedores en ningún caso, obteniendo una cantidad de ADN similar pero mayor degradación en el protocolo a partir de fragmentos óseos.

### ***3.2.4 Separación por densidad***

Recientemente, un estudio llevado a cabo por Fernandes et al. (2023) ha demostrado la eficacia de la técnica de separación por densidad en la recuperación de ADN endógeno.

La separación por densidad es una técnica utilizada habitualmente en el campo de las ciencias forenses para el análisis de suelos y sedimentos, permitiendo disgregar minerales, materia orgánica e incluso microplásticos (Willey et al., 1997). Su uso en la recuperación de ADN endógeno se basa en la premisa de que el ADN se encuentra fuertemente unido en agregados cristalinos, por lo que a mayor densidad de estos agregados, mayor cantidad de ADN se podría obtener de su extracción (Higgins & Austin, 2013). A su vez, la proporción de agregados cristalinos depende de los procesos diagenéticos que ocurren tras la muerte del individuo, de forma que la composición química de los restos óseos se altera dando lugar a regiones de diferentes densidades dentro de un mismo hueso dependiendo de la mineralización de la matriz ósea y los osteocitos (Fernandes et al., 2023).

El proceso por tanto, consiste en la centrifugación del polvo de hueso con un líquido pesado no tóxico llamado politungstato de sodio (SPT) que permite la separación de las partículas con mayor y menor densidad realizando la extracción a partir de aquellas más altas pudiendo obtener hasta 5,28 veces más de ADN endógeno que realizando el protocolo de extracción sin ningún pre-tratamiento (Fernandes et al., 2023).

### ***3.2.5 Discusión limpieza y pre-tratamiento***

Los pasos previos a la extracción del ADN a partir de restos óseos antiguos pueden determinar el éxito o fracaso final de la prueba genética. Generalmente, todos los laboratorios y protocolos especializados coinciden en la desinfección de las muestras, con el fin de eliminar la mayor cantidad de ADN endógeno posible, evitando así su interferencia en el análisis. Sin embargo, las opciones para su realización son diversas e incluso complementarias en algunos casos, otorgando una mayor complejidad a su selección. Mientras que todos los métodos poseen el riesgo de dañar el ADN endógeno, algunos son capaces de minimizarlo. Es el ejemplo de la eliminación física de la superficie externa, donde simplemente reduciendo la velocidad a la que se lija la capa más superficial del hueso, se deja de producir el calor que degradaría el ADN. Aun así, este método posee un gran inconveniente, y es que si no se realiza de forma adecuada, puede llevar a la contaminación cruzada entre muestras al liberar partículas finas de polvo al ambiente. Por el contrario, métodos como la inmersión en hipoclorito de sodio y la exposición a luz ultravioleta, son más propensos a dañar el ADN endógeno o incluso a no eliminar completamente el exógeno. Ya que en el primer caso, existe la posibilidad de que el material genético contaminante se fragmente y degrade, pudiendo confundirse con el ADN endógeno en el análisis, fenómeno que actualmente sigue en estudio; y en el segundo, en caso de encontrar muestras muy finas o porosas, la luz ultravioleta puede penetrar en el hueso, dañando tanto el ADN contaminante como el de interés. No obstante, la inmersión en lejía ha demostrado proporcionar resultados de calidad, al ser el método utilizado preferentemente en los laboratorios forenses para la desinfección de las muestras, habiendo sido optimizado con el tiempo (Tabla 2).

Una vez desinfectadas las muestras, no existe un consenso sobre de qué manera se deben preparar las muestras óseas para maximizar el ADN endógeno obtenido en la extracción.

Generalmente el procedimiento comienza con el corte, en caso de tener un gran tamaño, y la pulverización de las piezas óseas mediante un molino de congelación o *Freezer Mill* con el objetivo de aumentar la superficie efectiva que facilite la lisis de las células en la extracción del ADN. Sin embargo su mayor limitación reside en la posibilidad de generación de calor que dañe el ADN, motivo por el cual son varios los estudios que intentan evitar la pulverización aplicando procedimientos que incluyen la desmineralización total de la muestra. Dichos métodos se encuentran todavía en desarrollo, por lo que hasta el momento, la pulverización sigue siendo el método más usado para preparar las muestras, siendo capaz de evitar su mayor limitación mediante el uso de nitrógeno líquido. Previo al siguiente paso, conocido como desmineralización, algunos estudios han demostrado la utilidad de la separación por densidad del polvo de hueso, seleccionando para el análisis únicamente las partículas con mayor densidad y, teóricamente, aquellas que mayor cantidad de ADN contengan (Tabla 2).

Finalmente, la mayoría de protocolos previos a la extracción concluyen con la desmineralización, donde el EDTA disuelve la matriz mineral del hueso permitiendo la liberación del ADN. Aunque este procedimiento permita obtener mayores cantidades de ADN, todavía es necesaria su completa optimización, debido a la posible pérdida de material genético en alguno de sus pasos (Tabla 2).

**Tabla 2:** Comparativa de métodos de limpieza y pre-tratamiento de muestras óseas.

<b>Pre-tratamiento</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Inmersión en hipoclorito de sodio</b>	Desinfección y eliminación de ADN exógeno	Eficacia Eliminación de inhibidores de la PCR	Degradación de ADN exógeno puede generar perfiles confusos
<b>Exposición a luz ultravioleta</b>		Buena desinfección de materiales usados en el análisis	Degradación de ADN endógeno en muestras finas o porosas
<b>Eliminación física de la superficie externa</b>		Eficacia	Generación de calor que daña el ADN
<b>Pulverización</b>	Aumento de la superficie efectiva	Eficacia	Riego de contaminación
	Facilitar lisis de células	Uso habitual	Generación de calor que daña el ADN
<b>Desmineralización</b>	Disolución de la matriz mineral Liberación del ADN	Eficacia en combinación con otros métodos	Posible pérdida de ADN según protocolo
<b>Separación por densidad</b>	Aumento de la recuperación de ADN	Fácil realización	Técnica reciente, necesita más estudio

### **3.3 Métodos de extracción**

La extracción de ADN a partir de muestras óseas implica la lisis de las células, para romper la membrana celular y conseguir la liberación del ADN; la eliminación de contaminantes, como inhibidores de la PCR; y la purificación del ADN, aislándolo de todos los componentes celulares restantes. En este contexto, los pasos relacionados con la eliminación de contaminantes y la purificación, son determinantes para maximizar la recuperación de grandes cantidades de ADN de calidad que poder utilizar en el análisis.

#### ***3.3.1 Extracción orgánica***

La extracción orgánica es una técnica de extracción líquido-líquido capaz de separar las proteínas y lípidos de los ácidos nucleicos. En este método se utiliza una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para aislar el ADN en la fase acuosa de la solución después de romper las membranas celulares mediante dodecil sulfato de sodio (SDS), proteinasa K o hidróxido de sodio (NaOH) (Davoren et al., 2007).

A la hora de maximizar la cantidad de ADN extraído, este método es altamente eficaz comparado con otros como la extracción mediante resina magnética o la extracción en fase sólida (Finaughty et al., 2023). Además, la mayoría de estudios lo sitúan en los primeros puestos en cuanto a la obtención de perfiles STR a partir de restos óseos, obteniendo hasta 4 alelos más que el kit de uso preferente en el análisis de este tipo de muestras en laboratorios forenses (Haarkötter et al., 2023).

Cabe destacar, que los mejores resultados obtenidos mediante el método de extracción orgánica son aquellos en los que este proceso ha ido precedido de un protocolo de desmineralización, combinando así la eficiencia de la eliminación de inhibidores de la decalcificación con la capacidad de proporcionar ADN de alta pureza de este tipo de extracción (Jakubowska et al., 2012).

Sin embargo, a pesar de la eficiencia y versatilidad demostrada por el método (Ferreira et al., 2013), presenta importantes limitaciones. En primer lugar, los reactivos utilizados son tóxicos, suponiendo un peligro para la salud humana, por lo que requieren una manipulación y eliminación muy cuidadosa. Por otra parte, la cantidad de muestra requerida para este procedimiento es significativamente mayor que en el resto de métodos

de extracción, lo que limita el análisis si no se dispone de grandes porciones de hueso. Finalmente, es un proceso laborioso que requiere múltiples transferencias y manipulaciones, aumentando el riesgo de contaminación (Haarkötter et al., 2023).

### ***3.3.2 Extracción con sílice***

La extracción mediante sílice es un tipo de extracción en fase sólida utilizada con frecuencia para la extracción de ADN a partir de restos óseos (Finaughty et al., 2023). Éste método se basa en la adsorción de ácidos nucleicos (ADN en este caso) en sílice ( $\text{SiO}_2$ ) en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas después de la rotura de las membranas celulares por diferentes métodos (Orfao, 2011). Los residuos son eliminados mediante lavados sucesivos, eluyendo finalmente el ADN puro con agua.

Éste tipo de extracción se puede llevar a cabo mediante la adsorción del ADN en columnas o en partículas de sílice en suspensión. El primer método destaca por su alta eficiencia, sobretodo en términos de número de alelos obtenidos por gramo de polvo de hueso (Haarkötter et al., 2023). Sin embargo, el segundo método destaca por su capacidad para recuperar pequeños fragmentos de ADN de hasta 35 pares de bases, muy comunes en muestras altamente degradadas, pudiendo llegar a obtener fragmentos menores de 25 pares de bases con protocolos de publicaciones recientes (Xavier et al., 2021).

Al comparar esta extracción con otros métodos, los resultados varían entre publicaciones. Algunos estudios afirman que es capaz de obtener incluso tres veces más de ADN que la extracción orgánica (Hasap et al., 2020), mientras que otros, lo sitúan al final de su clasificación, asumiendo que el bajo rendimiento se debe a la pérdida de fragmentos de ADN por los excesivos lavados del protocolo (Finaughty et al., 2023). Sin embargo, todos coinciden en su eficacia para la extracción de ADN a partir de restos óseos con pequeños intervalos postmortem que han sido expuestos a condiciones ambientales extremas (Davoren et al., 2007).

### ***3.3.3 Extracción con perlas magnéticas***

Utilizado casi en el 50% de las investigaciones forenses, la extracción por bolas paramagnéticas es el método por excelencia para la obtención de ADN a partir de muestras óseas. En este proceso, el ADN liberado después de la rotura de las membranas de las células se une a microesferas de óxido de hierro cargadas positivamente. A continuación, se aplica un campo magnético externo que provoca la unión de las esferas al borde del tubo reteniendo el ADN durante el lavado. Finalmente, este ADN se eluye como muestra purificada mediante un tampón de elución (Finaughty et al., 2023).

Numerosos artículos destacan el éxito estadísticamente significativo de los métodos basados en perlas magnéticas para la obtención de perfiles genéticos completos al compararse con la extracción orgánica y con sílice (Harrel et al., 2018), atribuyendo su éxito a la capacidad de aislar el ADN de otros componentes celulares en un entorno líquido (Finaughty et al., 2023). Además, al igual que con la extracción orgánica, incorporando un paso de desmineralización, la cantidad de STR's obtenidos aumenta significativamente (Haarkötter et al., 2023).

Esta técnica es utilizada como base de numerosos kits comerciales especializados en la extracción de ADN a partir de muestras forenses, entre ellos destacan InnoXtract™ (InnoGenomics Technologies, Nueva Orleans, Los Ángeles, Estados Unidos) y PrepFiler™ BTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) como los más empleados, siendo ambos los que mejores resultados proporcionan al compararse con gran variedad de métodos de extracción. Entre ellos, la mayor eficiencia y rendimiento de ADN se obtiene con InnoXtract™, kit que también presenta el índice de degradación más elevado (Haarkötter et al., 2023). Sin embargo, en cuanto a la cantidad de alelos detectados, PrepFiler™ BTA funciona de manera más eficaz para muestras degradadas (Hasap et al., 2020).

Entre las principales desventajas de la extracción mediante perlas magnéticas, destaca su coste, debido a la necesidad de comprar el correspondiente kit. Sin embargo, sus numerosas ventajas como eficiencia, eliminación de inhibidores, rapidez y capacidad de automatización que reduce considerablemente el riesgo de contaminación, convierten a la técnica en una inversión altamente rentable (Haarkötter et al., 2023).

### ***3.3.4 Discusión métodos de extracción***

Existen gran diversidad de métodos que permiten extraer y aislar el ADN a partir de todo tipo de muestras, sin embargo, a la hora de realizarlo utilizando restos óseos como material de partida, solo unos pocos son capaces de proporcionar los resultados óptimos para un posterior análisis genético de calidad. Mientras todos los protocolos coinciden en la utilización de SDS y proteinasa K para la rotura de las membranas celulares y la degradación de las proteínas, el mayor debate se sitúa en torno a qué método permite aislar completamente el material genético obteniendo ADN puro con la mayor calidad y cantidad posible (Tabla 3).

En el caso de querer maximizar la cantidad de ADN extraído, únicamente dos métodos destacan. La extracción orgánica y la extracción mediante resina o partículas paramagnéticas han demostrado proporcionar cantidades de ADN suficientes para la obtención de perfiles genéticos completos en gran cantidad de estudios. Sin embargo, la eficiencia, versatilidad y seguridad del protocolo también juegan un papel muy importante a la hora de realizar análisis en el laboratorio, motivo por el cual la extracción orgánica comienza a ser sustituida por otros métodos como la extracción mediante sílice. Este tipo de extracción, aunque pueda disminuir la cantidad de material genético obtenido si no se realiza correctamente, permite la automatización del proceso, siendo además altamente eficaz para la recuperación de fragmentos más pequeños de ADN (Tabla 3).

En todo caso, actualmente, el método que mejores resultados proporciona es la extracción mediante perlas magnéticas, siendo capaz de combinar la obtención de grandes cantidades de ADN, con la automatización del proceso y la eliminación de inhibidores. Motivo por el cual la mayoría de kits desarrollados para la extracción de material genético a partir de restos óseos, lo utilizan como base (Tabla 3).

**Tabla 3:** Comparativa de los principales métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos humanos.

<b>Tipo de extracción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Extracción orgánica (fenol cloroformo)</b>	Alta eficiencia en recuperación de ADN	Toxicidad de reactivos	Muestras con cantidad suficiente de tejido óseo
	Buen rendimiento en perfiles STR	Procedimiento laborioso Alto riesgo de contaminación	Necesidad de maximizar la cantidad de ADN
	Alta eficacia tras desmineralización	Mayor cantidad de muestra requerida	
<b>Extracción con sílice (fase sólida)</b>	Automatizable Eficaz con fragmentos pequeños de ADN	Resultados variables según protocolo	Muestras altamente degradadas
	Seguridad	Riesgo de pérdida de ADN por lavados excesivos	Especialmente útil en ADN fragmentado
<b>Extracción con perlas magnéticas</b>	Alta eficiencia	Coste elevado	Entornos forenses rutinarios
	Disponibilidad de Kits comerciales		
	Rápida y automatizable Bajo riesgo de contaminación	Peligro por mayor índice de degradación	Necesidad de rapidez y automatización

## 4. CONCLUSIONES

En el contexto antropológico y de Memoria Histórica, la extracción de ADN es un paso de vital importancia para la identificación mediante análisis genético de los fallecidos. Numerosos protocolos y metodologías han sido desarrollados y testados con el fin de determinar cuál de ellos es capaz de maximizar tanto la cantidad como la calidad del material genético obtenido, aspectos que se encuentran altamente comprometidos debido al tiempo y las condiciones ambientales a las que los restos han sido expuestos. Así, en este Trabajo Fin de Máster, se han comparado todas estas metodologías en cada uno de los pasos realizados para la extracción de ADN a partir de restos óseos, permitiendo encontrar la combinación de métodos más eficaz.

En primer lugar, para obtener una extracción de ADN exitosa, es necesario seleccionar, entre las disponibles, la pieza o piezas que mejor conserven el material genético y a partir de las cuáles más se pueda obtener. En este caso, todos los estudios señalan al hueso petroso, seguido del calcáneo o el astrágalo y posteriormente los dientes. Otras piezas como las costillas, vértebras y huesos pequeños y esponjosos, pueden ser de utilidad en caso de no disponer de las mencionadas con anterioridad.

A continuación, el siguiente paso sería la desinfección de la muestra, eliminando toda la cantidad de ADN exógeno posible con el fin de evitar contaminaciones que afecten al perfil genético final. Para ello, lo más correcto sería, en el caso de huesos poco porosos y dientes, la inmersión o limpieza superficial con hipoclorito de sodio. En el caso de huesos porosos como el calcáneo, la utilización de una lija para eliminar la parte más superficial sería la más adecuada.

Después de la desinfección del resto, con el fin de maximizar la cantidad de material genético obtenido, es necesario someter la pieza a diferentes pre-tratamientos. En primer lugar, la pulverización mediante un mortero manual o un *Freezer Mill* que evite la generación de calor, permitiría aumentar la superficie efectiva para la lisis de las células. Posteriormente, con el objetivo de liberar el ADN de la matriz mineral a la que se encuentra unido, el polvo se sometería a un tratamiento de desmineralización con EDTA hasta obtener su disolución completa en este compuesto.

Finalmente, en cuanto al método de extracción a utilizar, después de la rotura de las membranas celulares mediante SDS y proteinasa K, un método automatizable, seguro y eficaz como la extracción mediante perlas magnéticas con el Kit PrepFiler™ BTA, proporcionaría resultados óptimos en cuanto a cantidad de STR's. Sin embargo, en caso de querer utilizar el ADN extraído para análisis mediante secuenciación masiva, otros métodos como la extracción mediante sílice serían más adecuados.

Cabe destacar, que aunque el método descrito obtendría los mejores resultados de forma general, diversos factores principalmente relacionados con el ambiente pueden influir en el análisis y la condición de las muestras. Así, la exposición a ambientes húmedos u acuáticos, especialmente con cambios bruscos de temperatura, pueden dañar el tejido mineralizado del hueso, desprotegiendo el ADN y provocando su degradación; por su parte, ambientes cálidos con temperaturas elevadas destruyen el material genético en mayor proporción y menor tiempo que las frías, favoreciendo además el crecimiento de microorganismos que puedan también dañar el ADN; el desarrollo de estos microorganismos también se ve influenciado por la disponibilidad de oxígeno, de forma que ambientes ricos en oxígeno igualmente producirían mayor degradación del ADN; por último, la composición de la tierra provoca una gran descomposición de la materia biológica cuando su pH se encuentra en condiciones ácidas o alcalinas, dificultando así la supervivencia del material genético. Por todos estos factores, estudios e investigaciones sobre la conservación del ADN en diferentes ambientes y su extracción utilizando métodos específicos que maximicen su cantidad deberían llevarse a cabo, pudiendo predecir las condiciones en las que se va a encontrar el material genético, adaptando con esta información el análisis a realizar.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Atlas del cuerpo humano—Esqueleto.* (2007). <https://ebooks.enfermeria21.com/ebooks/html5dev/284/?key=bTVoYldVOVVrOVdTVkpCSm01dlpHODINamcwSm1abFkyaGhQVEI3TWpVd05ESTBNVFI4T0NaMGFYQnZYM0J5YjNoNVBUQW1jR0Z6YzNkdmNtUTIWa2xTUjBsTVNRPT1kWE5sYw%3D%3D>
- Barta, J. L., Monroe, C., & Kemp, B. M. (2013). Further evaluation of the efficacy of contamination removal from bone surfaces. *Forensic Science International*, 231(1), 340-348. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.06.004>
- Bolaños, A. (2010). La Ley de Memoria Histórica y la búsqueda de los desaparecidos en España: Una aproximación desde la arqueología forense. *Arqueología y Sociedad*, 22, 73-82. <https://doi.org/10.15381/arqueolsoc.2010n22.e12289>
- Božič, L., Benedik Bevc, T., Podovšovnik, E., Zupanc, T., & Zupanič Pajnič, I. (2022). Comparison of DNA preservation between ribs and vertebrae. *International Journal of Legal Medicine*, 136(5), 1247-1253. <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02860-8>
- Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., & Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003>
- Charlton, S., Booth, T., & Barnes, I. (2020). The problem with petrous? A consideration of the potential biases in the utilization of pars petrosa for ancient DNA analysis. *World Archaeology*, 51(4), 574-585. <https://doi.org/10.1080/00438243.2019.1694062>
- Corrêa, H., Cortellini, V., Franceschetti, L., & Verzeletti, A. (2021). Large fragment demineralization: An alternative pretreatment for forensic DNA typing of bones. *International Journal of Legal Medicine*, 135(4), 1417-1424. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02531-0>
- Crespillo Marquez, M. C., & Barrio Caballero, P. A. (2019). *Genética forense: Del laboratorio a los tribunales* (1.<sup>a</sup> ed.).
- Davoren, J., Vanek, D., Konjhodžić, R., Crews, J., Huffine, E., & Parsons, T. J. (2007). Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croatian medical journal*, 48(4), 478-485.

- Di Stefano, B., Zupanič Pajnič, I., Concato, M., Bertoglio, B., Calvano, M. G., Sorçaburu Ciglieri, S., Bosetti, A., Grignani, P., Addoum, Y., Vetrini, R., Introna, F., Bonin, S., Previderè, C., & Fattorini, P. (2024). Evaluation of a New DNA Extraction Method on Challenging Bone Samples Recovered from a WWII Mass Grave. *Genes*, *15*(6), 672. <https://doi.org/10.3390/genes15060672>
- Edson, S. M. (2019). Extraction of DNA from Skeletonized Postcranial Remains: A Discussion of Protocols and Testing Modalities. *Journal of Forensic Sciences*, *64*(5), 1312-1323. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14050>
- Etxeberria, F. (2020). *Las exhumaciones de la Guerra Civil y la dictadura franquista 2000-2019*.
- Fernandes, D. M., Sirak, K. A., Cheronet, O., Novak, M., Brück, F., Zelger, E., Llanos-Lizcano, A., Wagner, A., Zettl, A., Mandl, K., Duffet Carlson, K. S., Oberreiter, V., Özdoğan, K. T., Sawyer, S., La Pastina, F., Borgia, E., Coppa, A., Dobeš, M., Velemínský, P., ... Pinhasi, R. (2023). Density separation of petrous bone powders for optimized ancient DNA yields. *Genome Research*, *33*(4), 622-631. <https://doi.org/10.1101/gr.277714.123>
- Ferreira, S. T. G., Paula, K. A., Maia, F. A., & Moraes, A. V. (2013). A comparative study between two protocols for DNA extraction from bones. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *4*(1), e374-e375. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.190>
- Finaughty, C., Heathfield, L. J., Kemp, V., & Márquez-Grant, N. (2023). Forensic DNA extraction methods for human hard tissue: A systematic literature review and meta-analysis of technologies and sample type. *Forensic Science International: Genetics*, *63*, 102818. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102818>
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., Gonzalez-Fortes, G., Mattiangeli, V., Domboróczki, L., Kővári, I., Pap, I., Anders, A., Whittle, A., Dani, J., Raczky, P., Higham, T. F. G., Hofreiter, M., Bradley, D. G., & Pinhasi, R. (2014). Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications*, *5*, 5257. <https://doi.org/10.1038/ncomms6257>
- Gaytmenn, R., & Sweet, D. (2003). Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *Journal of Forensic Sciences*, *48*(3), 622-625.
- Golob, A., Kravanja, P., Concato, M., Leskovar, T., & Zupanič Pajnič, I. (2024). Searching for alternative high DNA-yielding bone types for DNA analysis of aged

- skeletal remains. *Forensic Science International*, 362, 112184.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112184>
- Haarkötter, C., Vinueza-Espinosa, D. C., Gálvez, X., Saiz, M., Medina-Lozano, M. I., Lorente, J. A., & Álvarez, J. C. (2023). A comparison between petrous bone and tooth, femur and tibia DNA analysis from degraded skeletal remains. *ELECTROPHORESIS*, 44(19-20), 1559-1568.  
<https://doi.org/10.1002/elps.202300097>
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., & Allentoft, M. E. (2017). Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *PLoS ONE*, 12(1), e0170940.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940>
- Harrel, M., & Hughes-Stamm, S. (2020). A Powder-free DNA Extraction Workflow for Skeletal Samples. *Journal of Forensic Sciences*, 65(2), 601-609.  
<https://doi.org/10.1111/1556-4029.14197>
- Harrel, M., Mayes, C., Gangitano, D., & Hughes-Stamm, S. (2018). Evaluation Of A Powder-Free DNA Extraction Method For Skeletal Remains. *Journal of Forensic Sciences*, 63(6), 1819-1823. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13749>
- Hasap, L., Chotigeat, W., Pradutkanchana, J., Vongvatcharanon, U., Kitpipit, T., & Thanakiatkrai, P. (2020). A novel, 4-h DNA extraction method for STR typing of casework bone samples. *International Journal of Legal Medicine*, 134(2), 461-471. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02232-9>
- Heathfield, L. J., Haikney, T. E., Mole, C. G., Finaughty, C., Zachou, A. M., & Gibbon, V. E. (2021). Forensic human identification: Investigation into tooth morphotype and DNA extraction methods from teeth. *Science & Justice*, 61(4), 339-344.  
<https://doi.org/10.1016/j.scijus.2021.05.005>
- Higgins, D., & Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science & Justice*, 53(4), 433-441.  
<https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>
- Jakubowska, J., Maciejewska, A., & Pawłowski, R. (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *International Journal of Legal Medicine*, 126(1), 173-178.  
<https://doi.org/10.1007/s00414-011-0590-5>
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*. <https://www.nature.com/articles/nrg1455>

- Kemp, B. M., & Smith, D. G. (2005). Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International*, *154*(1), 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.11.017>
- Kendall, C., Eriksen, A. M. H., Kontopoulos, I., Collins, M. J., & Turner-Walker, G. (2018). Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *491*, 21-37. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.11.041>
- Koehn, K., Buettner, A., & Lindner, I. (2020). Effect of sodium hypochlorite decontamination on the DNA recovery from human teeth. *International Journal of Legal Medicine*, *134*(1), 93-99. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02174-2>
- Kulstein, G., Hadrys, T., & Wiegand, P. (2018). As solid as a rock—Comparison of CE- and MPS-based analyses of the petrosal bone as a source of DNA for forensic identification of challenging cranial bones. *International Journal of Legal Medicine*, *132*(1), 13-24. <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1653-z>
- Labanyi, J. (2006). Historias de víctimas: La memoria histórica y el testimonio en la España contemporánea. *Nueva Época*, *6*(24), 87-98.
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., & Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, *1*(2), 191-195. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
- Markovitsi, D. (2016). UV-induced DNA Damage: The Role of Electronic Excited States. *Photochemistry and Photobiology*, *92*(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/php.12533>
- Mundorff, A., & Davoren, J. M. (2014). Examination of DNA yield rates for different skeletal elements at increasing post mortem intervals. *Forensic Science International: Genetics*, *8*(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.08.001>
- Mundorff, A. Z. (2019). *Developing an Empirically Based Ranking Order for Bone Sampling: Examining the Differential DNA Yield Rates Between Human Skeletal Elements Over Increasing Post Mortem Intervals*.
- Mundorff, A. Z., Bartelink, E. J., & Mar-Cash, E. (2009). DNA Preservation in Skeletal Elements from the World Trade Center Disaster: Recommendations for Mass Fatality Management. *Journal of Forensic Sciences*, *54*(4), 739-745. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01045.x>

- Nizami, S. B., Hassan Kazmi, S. Z., Abid, F., Babar, M. M., Noor, A., Zaidi, N.-S. S., Khan, S. U., Hasan, H., Ali, M., & Gul, A. (2018). Chapter 6 - Omics Approaches in Forensic Biotechnology: Looking for Ancestry to Offence. En D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 111-129). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00006-3>
- Orfao, A. (2011). *PNT Extracción de Ácidos Nucleicos*.
- Otagiri, T., Sato, N., Shiozaki, T., Harayama, Y., Matsumoto, M., Kobayashi, K., & Asamura, H. (2024). An optimal skeletal element for DNA testing: Evaluation of DNA quantity and quality from various bone types in routine forensic practice. *Legal Medicine*, *68*, 102415. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2024.102415>
- Parker, C., Rohrlach, A. B., Friederich, S., Nagel, S., Meyer, M., Krause, J., Bos, K. I., & Haak, W. (2020). A systematic investigation of human DNA preservation in medieval skeletons. *Scientific Reports*, *10*, 18225. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75163-w>
- Pilli, E., Vai, S., Caruso, M. G., D'Errico, G., Berti, A., & Caramelli, D. (2018). Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archaeological bone samples via forensic approach. *Forensic Science International*, *283*, 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.12.023>
- Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Connell, S., Alpaslan-Roodenberg, S., Gerritsen, F., Moiseyev, V., Gromov, A., Raczky, P., Anders, A., Pietruszewsky, M., Rollefson, G., Jovanovic, M., Trinhhoang, H., Bar-Oz, G., Oxenham, M., Matsumura, H., & Hofreiter, M. (2015). Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PLoS ONE*, *10*(6), e0129102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129102>
- Ruiz, J. (2017). *Exhumación Gurrea de Gállego* [Graphic].
- Stan, E., Muresan, C.-O., Dumache, R., Ciocan, V., Ungureanu, S., Mihailescu, A., Daescu, E., Duda-Seiman, C., Menghiu, G., Hutanu, D., & Enache, A. (2024). From Jane Doe to Sofia: DNA Extraction Protocol from Bones and Teeth without Liquid Nitrogen for Identifying Skeletal Remains. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(10), 5114. <https://doi.org/10.3390/ijms25105114>
- Vanek, D., Saskova, L., & Koch, H. (2009). Kinship and Y-Chromosome Analysis of 7th Century Human Remains: Novel DNA Extraction and Typing Procedure for Ancient Material. *Croatian Medical Journal*, *50*(3), 286-295. <https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.286>

- Vinueza-Espinosa, D. C., Santos, C., Martínez-Labarga, C., & Malgosa, A. (2020). Human DNA extraction from highly degraded skeletal remains: How to find a suitable method? *ELECTROPHORESIS*, *41*(24), 2149-2158. <https://doi.org/10.1002/elps.202000171>
- Willey, P., Galloway, A., & Snyder, L. (1997). Bone mineral density and survival of elements and element portions in the bones of the Crow Creek massacre victims. *American Journal of Physical Anthropology*, *104*(4), 513-528. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199712\)104:4<513::AID-AJPA6>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199712)104:4<513::AID-AJPA6>3.0.CO;2-S)
- Xavier, C., Eduardoff, M., Bertoglio, B., Amory, C., Berger, C., Casas-Vargas, A., Pallua, J., & Parson, W. (2021). Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age. *Genes*, *12*(2), 146. <https://doi.org/10.3390/genes12020146>