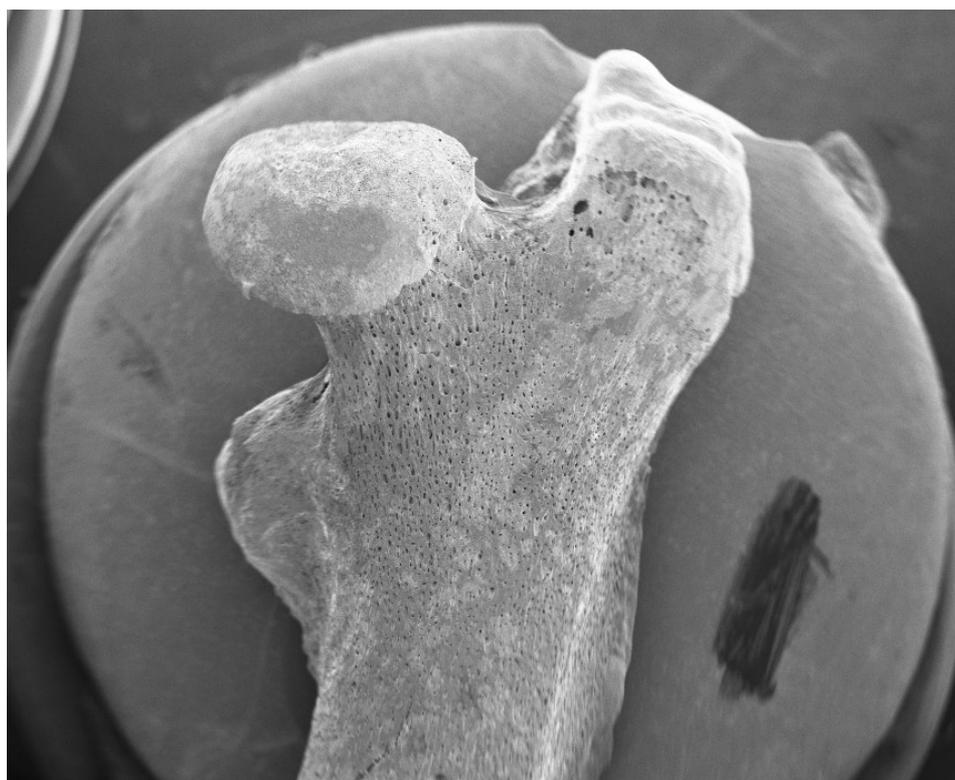




Tesis de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Evaluación de los efectos de la digestión química y enzimática
sobre las características morfológicas y el ADN de huesos de
mamíferos**



Mayo, 2024

Franco Elichiry

Tesista

Dr. Diego Fabián Castillo

Director



**Evaluación de los efectos de la digestión química y
enzimática sobre las características morfológicas y el
ADN de huesos de mamíferos**

Tesis para optar al grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Franco Elichiry

Tesista

Dr. Diego Fabián Castillo

Director

AGRADECIMIENTOS

A la Dras. Nora Sidorkewicj y Emma Casanave por permitirme realizar esta tesis en las dependencias de las Cátedras de Anatomía Comparada y Fisiología Animal del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

A la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional del Sur, al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (ANPCYT) por el apoyo económico al proyecto en general, del cual esta tesis forma parte.

A mi director, Dr. Diego Castillo, por sus consejos, colaboraciones, y enorme paciencia en el proceso de escritura.

A la Lic. Albertina Popp, por su predisposición a ayudarme cuando lo necesitaba, a darme consejos y recomendaciones a lo largo de este proceso.

Al Dr. Diego Nabaes por su ayuda al momento de realizar los análisis estadísticos.

A la Dra María Constanza Díaz Andrade, por cumplir su rol de Profesora Consejera cada vez que los necesité.

A Amaury, por estar desde siempre, y en especial por tu colaboración en el proyecto.

A Mari, muchas gracias por acompañarme en estos años, te quiero mucho.

A todas las personas maravillosas que conocí en la UNS, haciendo un práctico, tomando mates en un teórico, almorzando en el come, o simplemente charlando.

A todos los que me festejaron un chiste o que me hicieron reír.

A Cami, que sabe muchísimo de motos.

Al trabajo práctico de Geología que permitió juntarme con mis amigos y hermanos. Abel, Zapa, Negro, Joaco, Agus, Cuba, Fede, muchísimas gracias por hacer la carrera tan amena.

A mi familia, que siempre me acompañó.

A mis hermanas, Juli, Luni, Sofi. Las quiero y extraño mucho.

A mamá y papá. Gracias por mostrarme todos esos libros de animales (especialmente dinosaurios) y plantas cuando era chiquito.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	6
<i>Objetivos específicos</i>	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
<i>Preparación del material</i>	7
<i>Tratamientos de limpieza</i>	8
<i>Análisis morfológico de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza</i>	9
<i>Análisis de la concentración, calidad y pureza del ADN de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza</i>	11
RESULTADOS	13
<i>Análisis morfológico de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza</i>	13
<i>Análisis de la concentración, calidad y pureza del ADN de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza</i>	16
DISCUSIÓN.....	20
REFERENCIAS.....	23
ANEXO 1	28
ANEXO 2	29

RESUMEN

Las colecciones biológicas son repositorios únicos de biodiversidad que surgieron con el objetivo de exhibir curiosidades. En la actualidad, es posible utilizar su información asociada en estudios de múltiples disciplinas, lo que demanda especiales condiciones de conservación y almacenamiento del material allí depositado. A pesar de esto, no es poco común la falta de protocolos estandarizados que especifiquen los pasos a seguir en función de los elementos a limpiar, lo que puede provocar modificaciones cualitativas y/o cuantitativas en la muestra a estudiar. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de dos técnicas de preparación (utilizadas habitualmente en las colecciones) de material osteológico de mamíferos sobre sus características morfológicas y su material genético. Con este fin, se testearon 16 tratamientos de limpieza basados en digestión química y enzimática que variaron en el tiempo, la concentración y temperatura del agente utilizado en los miembros posteriores de ratas Wistar ($n = 5$ para cada tratamiento). Luego de su aplicación, los huesos fueron evaluados en términos de limpieza de forma cuantitativa y cualitativa, en forma macroscópica y mediante imágenes de microscopía electrónica. Siguiendo un protocolo estándar de fenol-cloroformo, se extrajo ADN de todas las muestras sometidas a tratamientos, y mediante espectrofotometría, se cuantificó su concentración, calidad y pureza. Los tratamientos químicos mostraron ser eficientes en cuanto a remoción de tejido blando, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control, mientras que los enzimáticos en general dejaron una proporción mayor de restos, sin diferenciarse estadísticamente del control. Con respecto a los resultados moleculares, para todos los tratamientos fue posible la extracción de ADN, si bien la concentración fue en general mayor para las muestras provenientes de los enzimáticos. Considerando todas las variables analizadas, el tratamiento de mejor desempeño fue el $\text{KOH}^{5\% \text{ 2hs } 70^\circ\text{C}}$. Este tratamiento presentó valores mínimos de restos de tejidos blandos, con una menor porosidad que otros tratamientos químicos. Con respecto a la concentración, pureza y contaminación de ADN, para las tres variables exhibió valores satisfactorios. Futuros estudios deberían incorporar otro tipo de tratamientos, así como también evaluar la calidad ósea y del ADN a largo plazo.

INTRODUCCIÓN

Las colecciones biológicas representan el patrimonio natural de un país o región, por ser fuente primaria de conocimiento y de información de la biodiversidad, razón por la cual deben ser protegidas, mantenidas y debidamente curadas, garantizando su permanencia en el tiempo (Kemp, 2015; Funk, 2018; Cook et al., 2020). En Argentina, las colecciones científicas albergan más de 60.000 especímenes de mamíferos que datan desde mediados del siglo XIX. Las mismas constituyen un archivo histórico natural de utilidad múltiple, donde la preservación de especímenes fósiles y actuales y su información asociada son la base de estudios taxonómicos, sistemáticos, morfológicos, ecológicos, filogenéticos, biogeográficos, de genética de poblaciones y de conservación, tornándose así en una parte fundamental para la generación de conocimiento de la diversidad y para el avance de las ciencias biológicas (Figura 1).

En un principio, las colecciones biológicas tenían el objetivo de exhibir curiosidades, siendo posible solo la preservación de materiales secos (Reid, 1994). Luego, a partir de mediados del siglo XVII, con el uso de la preservación de fluidos fue posible preservar materiales biológicos blandos y húmedos (Simmons, 2014). En los últimos años, los requerimientos de los especímenes conservados en colecciones biológicas han cambiado, debido al desarrollo de herramientas que permiten la observación y el estudio a escalas microscópicas o moleculares (Popp et al., 2023). Por lo tanto, en la actualidad es necesario encontrar soluciones efectivas para limpiar y preservar material biológico, no solo para su exposición, sino también para su estudio morfológico y molecular (Brown, 1999; Wandeler et al., 2007; Miller et al., 2020).



Figura 1. Exposición de elementos óseos en el Museo de Ciencias Naturales de La Plata, sala de Osteología Comparada. Fuente: (ILAM, 2019).

El desarrollo de técnicas moleculares para su aplicación en estudios zoológicos, especialmente las destinadas a la obtención de ácidos nucleicos, demandan tejidos biológicos inalterados, lo que promueve que en las colecciones se conserven las muestras (órganos y tejidos) *in vitro*. Debido a esto, además de extremarse el cuidado en los procesos de narcotización y eutanasia, los ejemplares deban ser conservados en un rango de temperatura de -20°C y -70°C , o en depósitos de nitrógeno líquido a -176°C (Sanchíz & Rodríguez, 1994). La conservación en estas condiciones implica el establecimiento de criocolecciones, pero el gasto económico destinado al mantenimiento e infraestructura que demandan es a menudo infranqueable. Diversos autores señalan que, debido a recortes presupuestarios, las colecciones biológicas a menudo se muestran descuidadas, dañadas, o sufren pérdidas, al mismo tiempo que el personal científico ve afectada su condición laboral (Kemp, 2015; Teta, 2021). En nuestro país, así como en otras partes del mundo, la frecuente dificultad de contar con los materiales para establecer criocolecciones, obliga a que los estudios a partir de ejemplares de museos dependan casi exclusivamente de elementos esqueléticos y pieles (Moraes-Barros & Morgante, 2007). Existen varios estudios que indican que el modo en que el material haya sido tratado, durante y después de la colecta, probablemente juegue un rol fundamental en este sentido (Pacheco et al., 2022). Sin embargo, los detalles de las técnicas de preservación a menudo no se incluyen con la información de los especímenes, lo que genera incertidumbre acerca de la calidad del ADN en la muestra. De este modo, la obtención de ADN a partir de especímenes de museo plantea un conjunto único de desafíos, ya que históricamente la preservación estuvo destinada a garantizar la integridad a largo plazo de la muestra en sí, pero no del material genético que contiene (McDonough et al., 2018).

Los métodos de preparación y conservación también juegan un rol preponderante en la calidad y cantidad de información relativa a aspectos morfológicos del material depositado en las colecciones. Los daños producidos por las técnicas convencionales de preparación de dientes y huesos, por ejemplo, pueden afectar no solo a las capas superficiales (grietas, descamación, porosidad) sino también a la estructura histológica, llegando en los casos más severos a la deformación o incluso a la desintegración (Fernández-Jalvo & Monfort, 2008). La identificación de estos cambios tiene utilidad también en otras disciplinas asociadas, por ejemplo, en el campo de la paleontología de vertebrados y en particular en estudios tafonómicos, donde se utilizan para determinar qué alteraciones en los materiales de colección pueden estar vinculadas a procesos y agentes naturales y cuáles están asociadas a la preparación de los mismos.

La falta de protocolos estandarizados que especifiquen los pasos a seguir en función de los elementos a limpiar, hace que los preparadores de especímenes y los taxónomos frecuentemente procedan según sus criterios o siguiendo procesos tradicionales, pero no necesariamente de la manera más adecuada (Muñoz-Saba et al., 2020).

Dentro de la amplia gama existente para la obtención de materiales biológicos, la preparación de elementos óseos de vertebrados es la que ofrece mayor cantidad de alternativas. El tejido óseo está compuesto principalmente por colágeno, que proporciona una matriz blanda y flexible, y minerales que añaden solidez y fuerza a la matriz. La matriz ósea inorgánica resultante, está compuesta principalmente por el mineral hidroxiapatita. Áreas extensamente calcificadas, dentro de este tejido, representan barreras físicas y químicas contra el deterioro del ADN debido al ambiente o ataques biológicos (Loreille et al., 2007). Por esta razón, los huesos son una excelente fuente de ADN en material osteológico de colecciones biológicas.

El hallazgo de un método que brinde los mejores resultados para preparar y conservar elementos óseos es una preocupación constante entre investigadores, técnicos forenses y curadores, sin existir aún un consenso generalizado (Fenton et al., 2003; Bemis et al., 2004; Mairs et al., 2004; Rennick et al., 2005; Steadman et al., 2006; Majeed, 2009; Leeper, 2015). Fernández-Jalvo & Monfort (2008), utilizando microscopía electrónica de barrido, analizaron las alteraciones en huesos producidas por algunas técnicas de preparación. Los efectos superficiales reportados por estos autores incluyeron la retención de grasa y restos de tejidos blandos, descamación, y aparición de grietas micro y macroscópicas. Dentro de las técnicas de preparación propuestas por los autores mencionados podemos destacar el uso de derméstidos, siendo el método preferido para limpiar huesos y cráneos por taxidermistas, museos, científicos, coleccionistas, aficionados, biólogos y educadores, especialmente en Europa. Sin embargo, además del potencial riesgo contaminante, la superficie ósea resulta dañada (surcos, agujeros) por las poderosas mandíbulas de estos animales. Los métodos que favorecen la proliferación bacteriana, tales como la maceración o putrefacción, pueden provocar pérdidas de material orgánico, especialmente colágeno (Smith et al., 2002) y ADN (Jans, 2008). El ataque bacteriano puede frenarse sometiendo el hueso a ebullición durante algunas horas, pero las altas temperaturas ocasionan desnaturalización del colágeno, provocando aumento de porosidad, deformación y alteración de la microestructura ósea (Fernández-Jalvo & Monfort 2008).

El uso de enzimas proteolíticas permite obtener buenos resultados, pero el proceso debe ser controlado estrictamente en cuanto a los tiempos de exposición para evitar que la digestión progrese hacia la matriz ósea (Fernández-Jalvo & Monfort, 2008). Las enzimas proteolíticas o proteasas son enzimas altamente específicas que inducen la descomposición de proteínas. Estas proteasas tienen como objetivo primario degradar al contenido proteico de los músculos y tejidos conectivos blandos (ligamentos, tendones y cartílago) en vez de la matriz ósea (Leeper, 2015). Las enzimas más utilizadas son papaína, pepsina, pancreatina y tripsina. Sin embargo, además del alto costo de las mismas (Chapman & Chapman, 1969; Sandström, 1969; Hill, 1975;) presentan un fuerte olor, especialmente en el caso de la papaína (Davis & Payne, 1992; Fenton et al., 2003; Mairs et al., 2004). Finalmente, pueden irritar y/o dañar la mucosa respiratoria al ser inhaladas en

forma de polvo (Mairs et al., 2004; Simonsen et al., 2011). Para evitar todos estos inconvenientes, una alternativa válida es el uso de detergentes comerciales de acción enzimática, que han demostrado buenos resultados a un bajo costo, sin olores desagradables y menores daños a la salud (Ossian, 1970; Mairs et al., 2004). Sumado a esto, Steadman et al. (2006) han reportado la extracción de ADN de calidad a partir de material óseo tratado con detergentes comerciales.

Entre las técnicas de digestión química, las soluciones alcalinas son las preferidas debido a que degradan colágeno y otras proteínas. Las soluciones de hidróxido de potasio en agua caliente maceran y desgrasan el hueso en simultáneo, con resultados similares a los obtenidos por digestión enzimática. Un aspecto a tener en cuenta, es el de lavar rápidamente el material osteológico al finalizar el tratamiento para evitar daños permanentes. Estos tratamientos de limpieza presentan la ventaja de ser económicos y sencillos en su preparación (Steadman et al., 2006; Fernández-Jalvo & Monfort, 2008). Los autores previamente mencionados sugieren además, que el uso de soluciones de hidróxido de potasio podría ofrecer la ventaja adicional de preservar el ADN, pero no existen estudios concluyentes al respecto.

Dado que las demandas actuales de las colecciones biológicas no solo se restringen a la exposición del material, y que cada vez con más frecuencia son fuente de estudios morfológicos y genéticos, resulta de vital importancia valorar el efecto de los tratamientos en el mismo. El uso de diferentes productos de limpieza sin un protocolo probado puede provocar modificaciones cualitativas y/o cuantitativas en la muestra a estudiar (Mateo-Lomba et al., 2023). Es deseable entonces que las consecuencias de cada uno de los tratamientos aplicados sean conocidas antes de iniciar el proceso de limpieza.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de dos técnicas convencionales de preparación (digestión enzimática y química) de material osteológico de mamíferos sobre sus características morfológicas y su material genético.

Objetivos específicos

- Analizar la eficiencia, de tratamientos de limpieza enzimáticos (jabón líquido) y químicos (KOH), sobre miembros posteriores de ratas Wistar a diferentes tiempos de exposición, concentraciones y temperaturas de los agentes utilizados.
- Estudiar macroscópicamente y microscópicamente los efectos de dichos tratamientos sobre la condición de la superficie ósea.
- Determinar el efecto de los tratamientos sobre el ADN del material óseo, a través de la cuantificación de la concentración, pureza y contaminación del material genético extraído luego de la limpieza.
- Definir un tratamiento de limpieza óptimo en función de las variables previamente consideradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material

Como modelo para evaluar los efectos de técnicas convencionales de preparación de material osteológico de mamíferos, se utilizaron 85 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 45 días de edad procedentes del Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur. La elección de este modelo se debe a que estas ratas se encuentran estandarizadas y son ampliamente utilizadas en investigaciones de laboratorio (Clause, 1998; Cossio-Bolaños et al., 2013). A su vez, los ejemplares utilizados para el presente estudio pertenecían al descarte de otros estudios que no incluyeron tratamientos químicos ni infección con patógenos (Protocolo CICUAE N° 181/2021).

Las ratas fueron sometidas a eutanasia por el personal del Bioterio mediante exposición a dióxido de carbono, siendo registradas las fechas de eutanasia, de inicio del procesamiento y de nacimiento de las mismas, así como la cantidad de ejemplares. Mediante elementos de disección, se aislaron los complejos músculo-esqueléticos de los miembros posteriores (estilopodio, zeugopodio y autopodio), removiendo la piel para la extracción, y registrando el peso con carne de cada miembro (Figura 2a). Luego de fotografiarlos en su cara externa, se removió el tejido muscular de los miembros, con especial cuidado de no dañar mecánicamente los huesos (Figura 2b). Se registró el peso luego de la remoción, procurando que los pesos sean homogéneos entre sí.

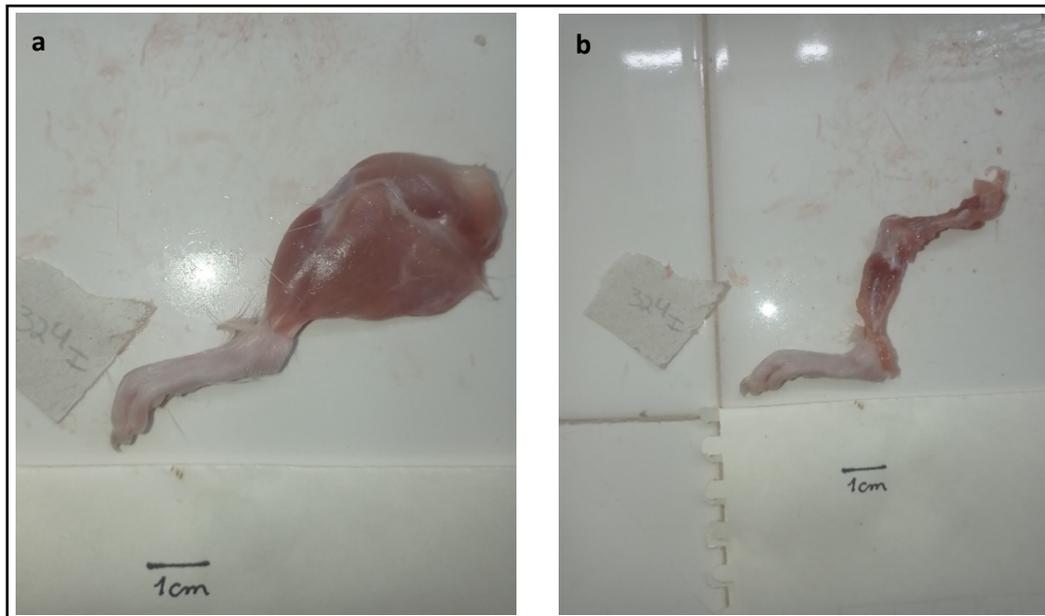


Figura 2. Vista de cara externa del miembro posterior izquierdo (a) con tejido muscular; (b) luego de la remoción mecánica del músculo.

Tratamientos de limpieza

En base a trabajos preliminares de nuestro grupo de estudio (Popp et al., 2023) se establecieron 16 tratamientos, basados en inmersión en una solución enzimática (n = 8; *Skip® Bio-Enzymes Liquid Soap E*) e inmersión en una solución de hidróxido de potasio (n = 8; KOH), que variaron en el tiempo (2 h y 4 h), la concentración (KOH 5 % y 10%; Jabón 10% y 15%) y temperatura del agente utilizado (40°C y 70°C; Tabla 1). Ambos agentes fueron disueltos en agua bidestilada. Cada tratamiento y el grupo control (miembros posteriores no sometidos a tratamientos) constó de 5 réplicas.

Tabla 1. Tratamientos de limpieza aplicados a los miembros posteriores de ratas Wistar. Se indica en cada caso la duración del tratamiento (h: horas), como así también la concentración (%) y la temperatura (°C) en los ensayos de digestión química (KOH) y enzimática (Jabón).

Método de limpieza	Tratamiento	Descripción
Digestión química	KOH (5%)	40°C
		2 h
		70°C
		4 h
	KOH (10%)	40°C
		2 h
		70°C
		4 h
Digestión enzimática	Jabón (10%)	40°C
		2 h
		70°C
		4 h
	Jabón (15%)	40°C
		2 h
		70°C
		4 h

Cada par de miembros posteriores (pertenecientes a la misma rata) fueron colocados en un frasco de vidrio, con 250 ml de la solución correspondiente a cada tratamiento. Dichos frascos fueron llevados a una estufa precalentada con la temperatura correspondiente a su tratamiento.

Luego de cumplir el tiempo especificado se los extrajo, registrándose una serie de variables cualitativas (olor, calidad del hueso, textura y facilidad de remoción del tejido blando) de acuerdo a los parámetros establecidos por Thompson, 2015. Dicho autor asignó un valor de 1 a 5 conforme a las características de las variables observadas (Tabla 2).

Tabla 2. Variables cuantitativas observadas y su valoración (Val), en escala de 1 a 5, según Thompson, 2015.

Val	Olor	Textura del tejido blando	Facilidad de remoción del tejido blando	Calidad del hueso
1	Fuerte. Impregna el medio y se disipa rápidamente.	Firme y/o sólida; puede sentirse más resistente o más elástica que cuando se sumergió por primera vez.	Firme y/o elástico; remoción difícil, si no imposible, sin dañar el hueso.	Calidad ósea frágil, fácilmente rota.
2	Fuerte. Impregna el medio y se disipa lentamente.	Tan maleable como cuando se observó originalmente.	Adherencia al hueso bastante fuerte; poco posible remover tejido sin dañar el hueso.	Sin erosión cortical, hueso más ligero y poroso.
3	Moderado, que se disipa lentamente	Considerablemente más suave que cuando comenzó el experimento. Muy maleable.	Aún elástico; removible con una considerable fuerza manual.	Más suave y maleable que lo normal. Sin daño cortical.
4	Moderado, que se disipa rápidamente.	Más elástico que cuando fue sumergido; aparente licuefacción y separación del tejido del hueso.	Adherencia al hueso moderadamente fuerte, porciones grandes fácilmente removibles; el núcleo de tejido cerca del hueso aún está adherido.	Erosión y/o descamación de la corteza, pero el hueso no se rompe fácilmente.
5	Poco o ninguno.	Casi licuado, flota en la superficie con poca o ninguna conexión al hueso.	Adherencia mínima o nula; el tejido se desprende al remover los huesos en la solución, o simplemente es removido al tacto	Fuerte y normal en textura y calidad.

Finalizados los tratamientos, el material se enjuagó para eliminar los restos de los agentes de limpieza, y se dejó secar al aire libre.

Análisis morfológico de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza

Para el análisis morfológico, los estilopodios izquierdos fueron procesados y fotografiados por microscopía electrónica de barrido SEM. Para el estudio se empleó un SEM marca LEO, modelo EVO 40 XVP (2004) acoplado a un sistema EDS marca Oxford, modelo X-Max 50 (2017), con la finalidad de evaluar la limpieza (en función de los tejidos remanentes adheridos al hueso) y la condición de la superficie ósea (porosidad, descamación, grietas).

A partir de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica, se realizaron los siguientes análisis:

-Cuantitativos: en cada imagen, se coloreó digitalmente las porciones libres y las cubiertas de tejidos, mediante el programa de edición de imágenes Gimp (GIMP: GNU *Image Manipulation Program*; Figura 3). Luego, se desarrolló un aplicativo para computar el número de píxeles con tejido y sin tejido, utilizando las librerías *ImageIO* y *NumPy* (Phyton). De esta manera, se calculó el porcentaje de tejido remanente, bajo las siguientes condiciones:

- Fotografías del fémur izquierdo, con aumento 25X.
- Campo de análisis de 600 x 400 píxeles, el cual siempre debía incluir la cabeza del fémur en el extremo izquierdo superior.

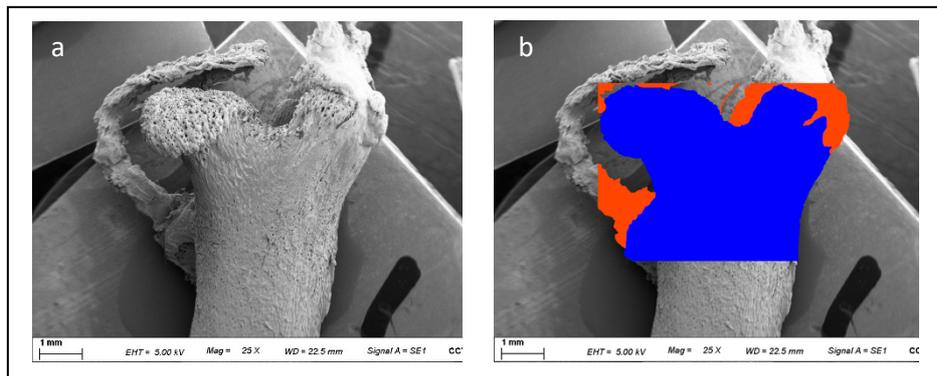


Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica. En (a) se observa la imagen original, y en (b) la edición mediante GIMP.

Como variable de respuesta del modelo se consideró el número de píxeles con tejido respecto del número total de píxeles. En general este tipo de variables siguen una distribución binomial. Un método adecuado para analizar estos datos son los modelos lineales generalizados (GLM). Dado que los datos presentaron una sobredispersión (la variabilidad observada en los datos fue mayor a lo esperada según la distribución binomial), se asignó un factor aleatorio a cada observación (Harrison, 2014). Para incorporar estos efectos, frecuentemente se utilizan modelos mixtos, y en este caso se utilizó la función *glmer* del paquete *lme4* (Bates et al., 2008). Los tratamientos donde el número de píxeles con tejido fue 0 fueron excluidos del análisis.

Para evaluar estadísticamente si existían diferencias en la eficiencia de limpieza de los diferentes tratamientos, se utilizó la función ANOVA del paquete *car* (Fox & Weisberg, 2018), mientras que para las comparaciones entre tratamientos se realizó un test de Tukey, con la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2022). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R Studio versión 2023.12.1+402 (R Core Team, 2020).

-Cualitativos: Se examinaron las fotografías de microscopía electrónica (con aumento de 25 X) con el objeto de evaluar el grado de deterioro, en función de la porosidad observable. Al igual que con las otras variables cualitativas observadas post-tratamiento, se utilizó una valoración de los grados de porosidad, pero en una escala de 1 a 3 (Tabla 3, Figura 4).

Tabla 3. Grado de porosidad observada en imágenes de microscopía electrónica con aumento de 25X y su correspondiente valoración.

Valoración	Grado de porosidad
1	Alta, porosidad marcada en epífisis y diáfisis, claramente carcomidas.
2	Media, porosidad moderada en epífisis y diáfisis.
3	Baja o nula, o no es observable debido a los restos de tejido.

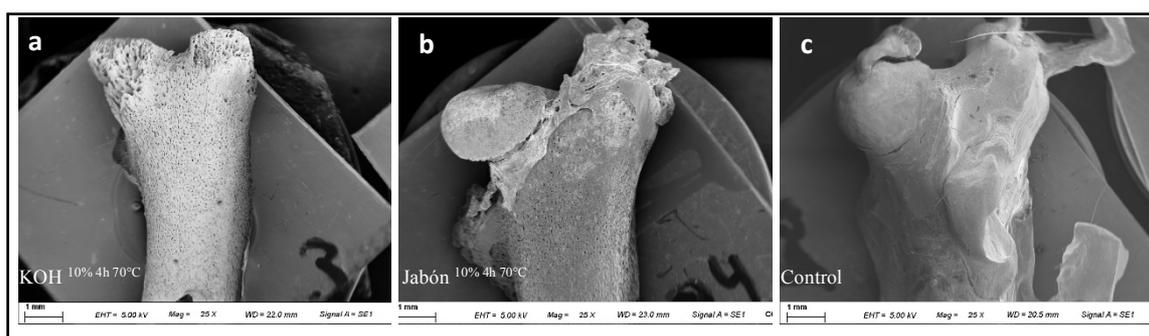


Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica con aumento de 25X de un hueso con porosidad: a: alta (valoración 1), b: media (valoración 2) y c: baja o nula (valoración 3).

Análisis de la concentración, calidad y pureza del ADN de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza

Con el objetivo de evaluar si la aplicación de los diferentes métodos de limpieza afectaba la concentración, calidad y pureza del ADN, se procedió a su extracción. Con este fin se molieron, con mortero, 5 mg de hueso (zeugopodio izquierdo) previamente sometido a tratamiento. Dicho procedimiento se realizó en el Laboratorio de Genética para la Conservación (GENCON-INBIOSUR) mediante un protocolo modificado de fenol-cloroformo (Samsuwan et al., 2018; Anexo I), utilizándose en todo momento una máscara con filtro como medida de seguridad. Con el objeto de minimizar la contaminación del ADN extraído, entre cada muestra procesada, se procedía a la limpieza con lavandina y alcohol de las superficies del laboratorio, mientras que el mortero era expuesto durante 5 minutos a luz UV. Una vez que el ADN era extraído, el mismo se resuspendía en 50 μ l de buffer TE (Tris-EDTA), y se almacenaba a -20°C hasta el momento de su cuantificación.

La cuantificación de la concentración de ADN de cada una de las muestras se realizó mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop® (ThermoFisher). La molécula de ADN absorbe la energía radiante a una longitud de onda específica (260 nm), a partir de lo cual es posible medir su concentración en solución. Es bastante común que, durante el proceso de extracción, las

muestras de ácido nucleico se contaminen con otras moléculas (proteínas, compuestos orgánicos). Una de las ventajas de usar el análisis espectrofotométrico es la capacidad de determinar la pureza de la muestra usando la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm ($A_{260}/280$, la cual para el ADN puro debe ser cercana a 1,8). La presencia de contaminantes (proteínas y fenol) dan como resultado relaciones menores a 1,6. Si la relación es mayor que 2,1 indica contaminación del ADN con ARN. Finalmente, el valor de esta relación también se ve afectado por el pH de la solución (pH ácido baja el valor; pH básico lo incrementa). Otra proporción a tener en cuenta es la $A_{260}/230$, que debería ser mayor a 2. Valores inferiores indican contaminación por compuestos orgánicos: EDTA, TRIzol, derivados de guanidina, fenoles, sales caotrópicas o hidratos de carbono.

En forma exploratoria se realizaron histogramas de frecuencia para la concentración de ADN, y se observó que dicha variable era asimétrica por lo que se utilizaron modelos lineales generalizados, con función de enlace logaritmo. En particular, modelos con distribución gamma que presentan más flexibilidad que la distribución normal que ajustaron exitosamente a los datos, con la función *glm* del paquete stats (R Core Team, 2020).

En cuanto a la pureza del ADN y la contaminación de las muestras, el análisis previo evidenció heterocedasticidad entre los tratamientos, por lo que se utilizaron modelos mixtos para incorporar una estimación de varianza para cada tratamiento, con la función *varIdent* del paquete nlme (Pinheiro et al., 2007). Para el ajuste del modelo se usó la función *gls* del paquete nlme.

Para detectar si existían diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en las tres variables examinadas (concentración de ADN, pureza y contaminación) se utilizó la función ANOVA del paquete car (Fox & Weisberg, 2018), mientras que para las comparaciones de a pares se realizó un test de Tukey, con la función *emmeans* del paquete emmeans (Lenth, 2022).

RESULTADOS

Análisis morfológico de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza

En términos de limpieza de la superficie ósea, los tratamientos químicos mostraron un mejor desempeño que los enzimáticos en cuanto al porcentaje de tejido remanente (Tabla 4). En los tratamientos de $\text{KOH}^{5\% \ 4\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{10\% \ 2\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{10\% \ 4\text{h} \ 40^\circ\text{C}}$ y $\text{KOH}^{10\% \ 4\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$ no se observaron restos de tejido en la superficie evaluada (Tabla 4). En promedio, en ninguno de los tratamientos enzimáticos a 40°C la superficie libre de restos de tejido alcanzó el 50 % (Tabla 4).

Tabla 4. Media y desvío estándar (DE) del porcentaje de tejido remanente sobre la superficie de hueso analizada, obtenida en los diferentes tratamientos de limpieza.

Tratamientos	Promedio del porcentaje de restos de tejido	DE
Control	67,79	14,21
Jabón ^{10% 2h 40°C}	56,12	19,22
Jabón ^{10% 2h 70°C}	30,12	17,91
Jabón ^{10% 4h 40°C}	63,41	21,09
Jabón ^{10% 4h 70°C}	32,76	8
Jabón ^{15% 2h 40°C}	58,76	22,61
Jabón ^{15% 2h 70°C}	35,82	15,64
Jabón ^{15% 4h 40°C}	70,98	19,25
Jabón ^{15% 4h 70°C}	55,37	19,21
$\text{KOH}^{5\% \ 2\text{h} \ 40^\circ\text{C}}$	9,82	6,19
$\text{KOH}^{5\% \ 2\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$	0,38	0,86
$\text{KOH}^{5\% \ 4\text{h} \ 40^\circ\text{C}}$	1,98	2,94
$\text{KOH}^{5\% \ 4\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$	0	0
$\text{KOH}^{10\% \ 2\text{h} \ 40^\circ\text{C}}$	5,31	7,75
$\text{KOH}^{10\% \ 2\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$	0	0
$\text{KOH}^{10\% \ 4\text{h} \ 40^\circ\text{C}}$	0	0
$\text{KOH}^{10\% \ 4\text{h} \ 70^\circ\text{C}}$	0	0

Excluyendo aquellos que limpiaron completamente la superficie del hueso, los análisis revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la proporción de tejidos remanentes entre los diferentes tratamientos ($\chi^2 = 189,81$; g.l. =12; $p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el control y los tratamientos enzimáticos (Tabla 4, Figura 5, Anexo 2). Al evaluar los tratamientos enzimáticos, solo Jabón^{15% 4h 40°C} difirió estadísticamente de Jabón^{10% 2h 70°C} y Jabón^{10% 4h 70°C} (Figura 5, Anexo 2). En cambio, todos los tratamientos químicos evaluados dejaron significativamente una menor proporción de tejido que el control. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de Jabón^{10% 2h 70°C},

Jabón^{10% 4h 70°C} y Jabón^{15% 2h 70°C} con los tratamientos de KOH^{5% 2h 40°C} y KOH^{5% 4hs 70°C} (Figura 5, Anexo 2).

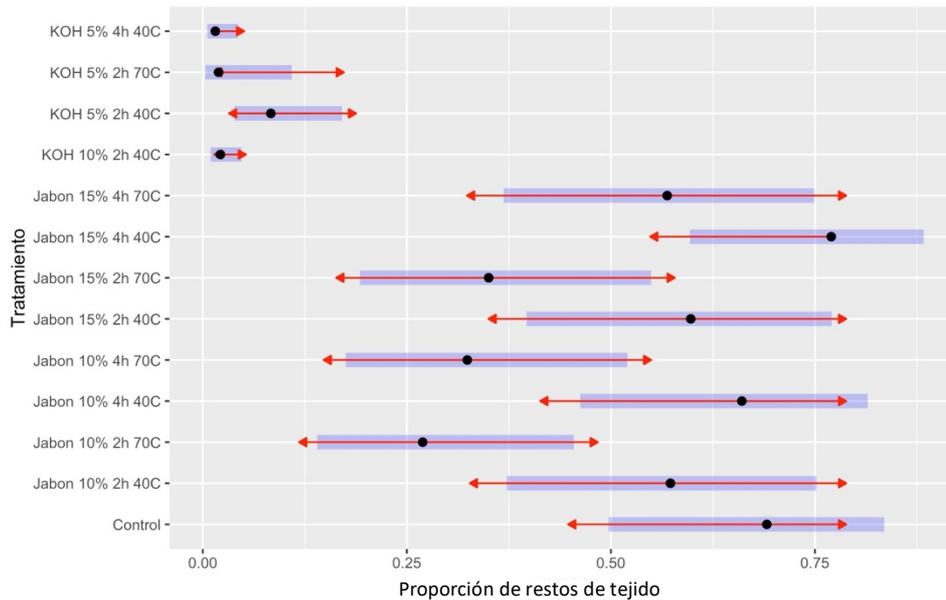


Figura 5. Medias (puntos), varianzas (sombreado) e intervalos de confianza del 95% (líneas rojas) de la proporción de restos de tejido sobre la superficie de hueso analizada, en los diferentes tratamientos de limpieza.

El resultado del análisis morfológico cualitativo se resume en la Figura 6. En todos los tratamientos, los restos fueron removidos con más facilidad que en el control y exceptuando el Jabón^{10% 4h 40°C}, Jabón^{15% 2h 40°C}, Jabón^{15% 4h 40°C}, también fueron superiores cuando se evaluó la textura del tejido blando. Exceptuando al KOH^{10% 4h 70°C}, el cual produjo un visible deterioro del material, no se detectaron diferencias al analizar la calidad del hueso entre todos los tratamientos (Figura 6). En general, los procedimientos con KOH tuvieron mayores puntajes en las categorías de olor, textura del tejido blando y la facilidad de remoción que los tratamientos enzimáticos, aunque mostraron desempeño inferior a estos cuando se evaluó la porosidad (Figura 6).

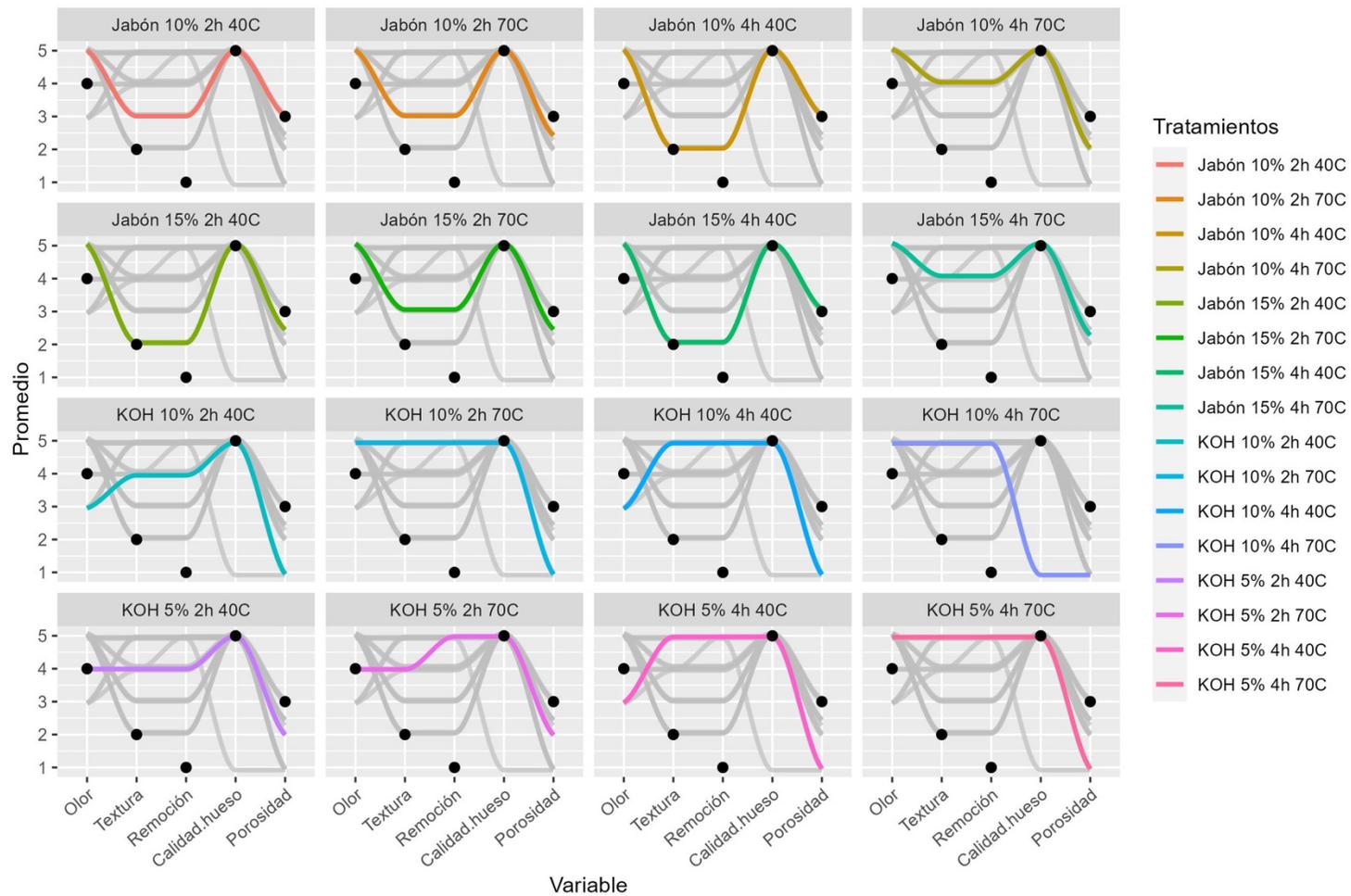


Figura 6. Valoración promedio del olor, textura del tejido blando, calidad del hueso, facilidad de remoción del tejido blando (de 1 a 5 según Thompson, (2015) y porosidad observable en las imágenes de microscopía electrónica (de 1 a 3) del material óseo sometido a los diferentes tratamientos de limpieza. Los puntos negros se corresponden con los valores alcanzados por el tratamiento control.

Análisis de la concentración, calidad y pureza del ADN de los huesos sometidos a los tratamientos de limpieza

La concentración de ADN en las muestras óseas varió significativamente entre los diferentes tratamientos ($\chi^2 = 130,15$; g.l. = 16; $p < 0,001$). Se observó que, en general, los tratamientos con jabón presentan una mayor concentración de ADN que los tratamientos con KOH (Tabla 5).

Tabla 5. Medias y desvíos estándares (DE) de la concentración, índice de pureza (A260/280) y contaminación (A260/230) del ADN extraído de los huesos sometidos en los diferentes tratamientos de limpieza.

Tratamiento	Concentración (ng/uL)	DE	A260/280	DE	A260/230	DE
Control	4842,14	1877,92	1,89	0,05	2,06	0,09
Jabón ^{10% 2h 40°C}	3306,81	2617,34	1,79	0,09	1,90	0,17
Jabón ^{10% 2h 70°C}	1396,01	1696,54	1,75	0,04	1,86	0,14
Jabón ^{10% 4h 40°C}	4240,07	3304,93	1,82	0,08	1,81	0,14
Jabón ^{10% 4h 70°C}	1502,99	1424,98	1,73	0,15	1,96	0,21
Jabón ^{15% 2h 40°C}	2221,88	878,28	1,70	0,09	1,77	0,11
Jabón ^{15% 2h 70°C}	4890,91	3047,83	1,83	0,05	1,95	0,17
Jabón ^{15% 4h 40°C}	3103,15		1,81	0,09	1,81	0,14
		1478,60				
Jabón ^{15% 4h 70°C}	2693,22	1936,49	1,80	0,04	1,83	0,16
KOH ^{5% 2h 40°C}	966,34	469,02	1,55	0,06	1,57	0,16
KOH ^{5% 2h 70°C}	933,88	641,85	1,66	0,08	1,78	0,14
KOH ^{5% 4h 40°C}	536,12	317,78	1,55	0,11	1,51	0,15
KOH ^{5% 4h 70°C}	602,77	258,43	1,81	0,08	2,16	0,09
KOH ^{10% 2h 40°C}	500,13	182,45	1,59	0,07	1,78	0,11
KOH ^{10% 2h 70°C}	924,06	327,85	1,82	0,05	2,05	0,08
KOH ^{10% 4h 40°C}	630,72	267,55	1,62	0,14	1,72	0,23
KOH ^{10% 4h 70°C}	599,81	198,97	1,76	0,10	2,14	0,20

A pesar de ser menores, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de ADN de las muestras de los tratamientos enzimáticos y el control (Figura 7, Anexo 2). Por el contrario, los tratamientos químicos presentaron concentraciones estadísticamente menores cuando se compararon con el control (Figura 7, Anexo 2).

Entre los tratamientos enzimáticos, las diferencias en las concentraciones de ADN no fueron significativas (Figura 7, Anexo 2). Lo mismo sucedió entre los tratamientos de químicos. Al comparar los tratamientos enzimáticos con los químicos, la concentración de ADN del tratamiento de Jabón^{15% 2h 70°C} fue significativamente mayor a la de todos los tratamientos con KOH (Figura 7, Anexo 2).

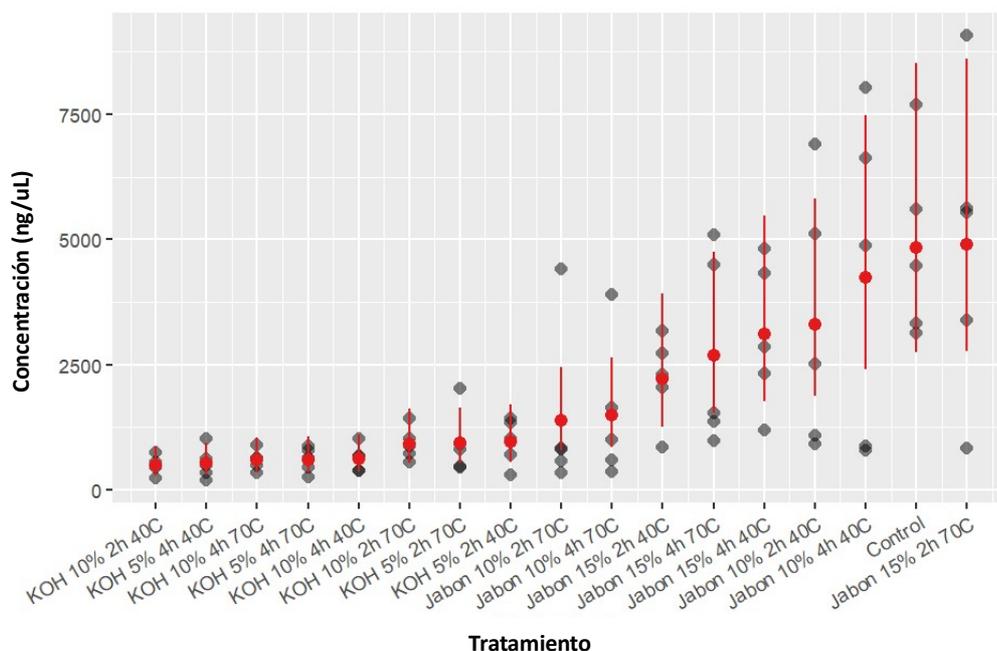


Figura 7. Concentración (ng/uL) del ADN extraído de los huesos sometidos en los diferentes tratamientos de limpieza. Los puntos grises indican la concentración de cada réplica, y los rojos la media de cada tratamiento. Las líneas rojas muestran los intervalos de confianza del 95%.

Con respecto a la pureza del ADN obtenido, esta varió entre los tratamientos ($\chi^2 = 152,92$; g.l. = 16; $p < 0,001$). El grado de pureza promedio del ADN extraído de los huesos sometidos a los diferentes tratamientos, en general fue aceptable (ADN puro: $A260/280 \sim 1,8$). Solo los tratamientos de $\text{KOH}^{5\% 2h 40^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 4h 40^\circ\text{C}}$ y $\text{KOH}^{10\% 2h 40^\circ\text{C}}$ presentaron proporciones promedio menores a 1,6 que podrían indicar la presencia de proteínas y fenol (Tabla 5, Figura 8).

Las comparaciones de a pares (Figura 8, Anexo 2) no detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos enzimáticos y el control en cuanto al grado de pureza del ADN. De los tratamientos químicos, $\text{KOH}^{10\% 4h 40^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 2h 40^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 2h 70^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 4h 40^\circ\text{C}}$ si presentaron diferencias significativas con el control (Figura 8, Anexo 2).

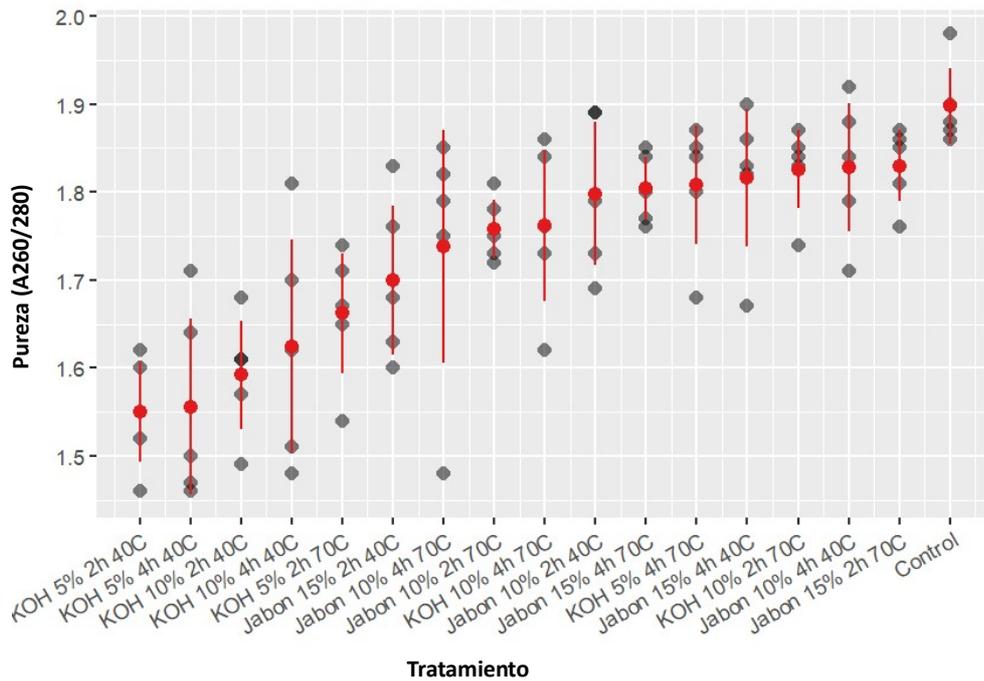


Figura 8. Pureza (relación A260/280) del ADN extraído de los huesos sometidos a los diferentes tratamientos de limpieza. Los puntos grises indican la concentración de cada réplica, y los rojos la media de cada tratamiento. Las líneas rojas muestran los intervalos de confianza del 95%.

Finalmente, el análisis de la contaminación del ADN extraído, definida por la relación de absorbancia 260 nm/230 nm, también varió entre los tratamientos ($\chi^2= 111,92$; g.l.= 16; $p < 0,001$). Exceptuando $\text{KOH}^{10\% 2h 70^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 4h 70^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{10\% 2h 70^\circ\text{C}}$ y $\text{KOH}^{10\% 4h 70^\circ\text{C}}$, los restantes tratamientos presentaron valores promedios menores a 2 que indican una posible contaminación por compuestos orgánicos (Tabla 5, Figura 9).

Las comparaciones de a pares (Figura 9, Anexo 2) no encontraron diferencias significativas en el grado de contaminación entre el control y los tratamientos enzimáticos, a excepción del de Jabón^{15% 2hs 40°C} ($p = 0,019$). Los tratamientos químicos de $\text{KOH}^{10\% 2hs 40^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{10\% 4hs 40^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 2hs 40^\circ\text{C}}$, $\text{KOH}^{5\% 2hs 70^\circ\text{C}}$ y $\text{KOH}^{5\% 4hs 40^\circ\text{C}}$, difirieron significativamente del control (Figura 9, Anexo 2).

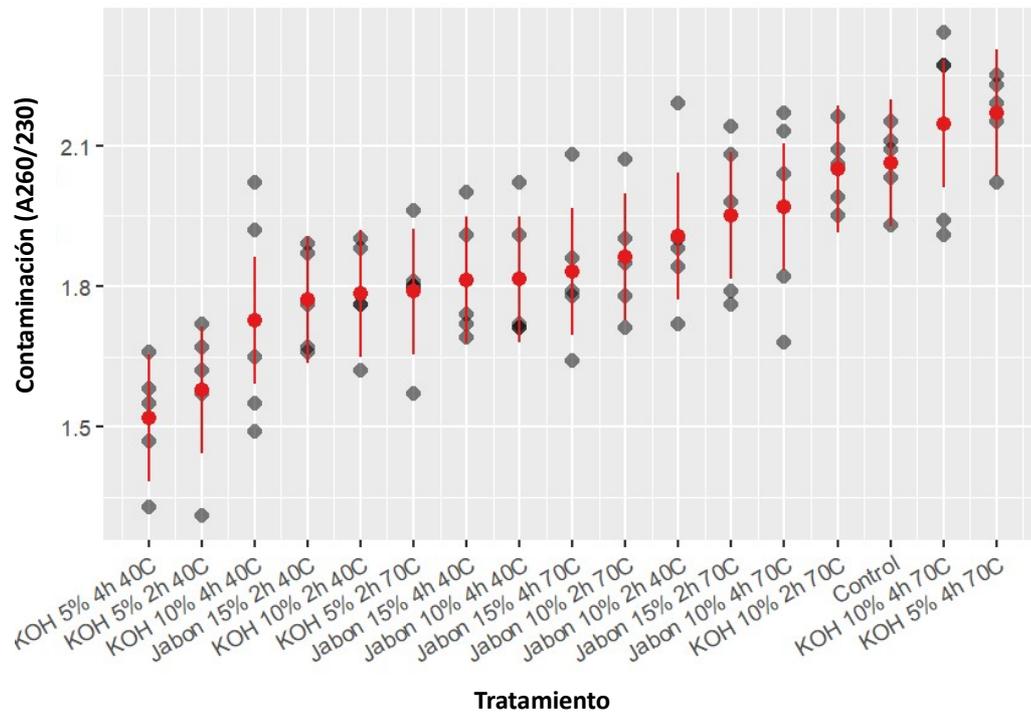


Figura 9. Contaminación (relación A260/230) del ADN extraído de los huesos sometidos a los diferentes tratamientos de limpieza. Los puntos grises indican la concentración de cada réplica, y los rojos la media de cada tratamiento. Las líneas rojas muestran los intervalos de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

Los distintos tratamientos enzimáticos y químicos desarrollados en este estudio presentaron diferencias en los términos de limpieza de hueso y conservación del tejido óseo. A su vez, se encontraron diferencias en la concentración, pureza y contaminación del ADN.

Los huesos de ratas sometidos a los tratamientos de remoción de tejidos blandos presentaron elevados niveles de limpieza de los tejidos en todos los tratamientos químicos, con un rendimiento creciente a medida que aumentaban la concentración de hidróxido de potasio, la temperatura o el tiempo de exposición a los agentes. Es sabido que las soluciones con hidróxido de potasio maceran y desgrasan los huesos, aunque debe vigilarse su concentración y tiempo de exposición para evitar daños en los mismos (Steadman et al., 2006; Fernández-Jalvo & Monfort, 2008). Así mismo, se recomienda lavar el material con agua al finalizar el tratamiento (Steadman et al., 2006). Los aumentos de temperatura aceleran los procesos de digestión, desnaturalizando las proteínas de los tejidos blandos. A partir de los 60°C el colágeno se desnaturaliza, afectando también al tejido óseo (Leeper, 2015). Esto explica que tratamientos como $\text{KOH}^{10\% \text{ 4h } 40^\circ\text{C}}$ o $\text{KOH}^{5\% \text{ 4h } 70^\circ\text{C}}$ a pesar de realizar una completa remoción del tejido adherido al hueso, ocasiona un daño de la superficie mayor a los tratamientos como $\text{KOH}^{5\% \text{ 2h } 40^\circ\text{C}}$ y $\text{KOH}^{5\% \text{ 2h } 70^\circ\text{C}}$.

Es importante destacar que el daño sobre la superficie ósea (aumento de la porosidad y fracturas), solo pudo ser observado microscópicamente, ya que a simple vista solo el tratamiento $\text{KOH}^{10\% \text{ 4hs } 70^\circ\text{C}}$ (que posee la mayor concentración, tiempo de exposición y temperatura) mostró un deterioro evidente del material. Un incremento de la porosidad del hueso, además aumentar su fragilidad, puede afectar la conservación del mismo a largo plazo, debido que representa un área aumentada en la que los microorganismos pueden actuar (Jans et al., 2004). Este trabajo suma evidencias a lo que ya ha sido reportado en otros estudios (Fernández-Jalvo & Monfort, 2008), donde este tipo de tratamientos químicos suele destruir la superficie ósea y la macroestructura del hueso cuando se excede en el tiempo de exposición o la concentración de los agentes.

Los métodos de limpieza enzimáticos fueron menos eficientes al momento de remover el tejido blando de los huesos tratados. Solo aquellos que utilizaban una temperatura de 70°C tuvieron rendimientos estadísticamente similares, a los métodos químicos de peor desempeño. Si bien en estos tratamientos no se observaron, a nivel macroscópico, daños en la superficie ósea, microscópicamente la misma presentó porosidades comparables a la de los tratamientos $\text{KOH}^{5\% \text{ 2h } 40^\circ\text{C}}$ y $\text{KOH}^{5\% \text{ 2h } 70^\circ\text{C}}$. La desnaturalización del colágeno producida por la alta temperatura de la solución podría explicar este resultado (Fernández-Jalvo & Monfort, 2008).

En las muestras sometidas a tratamientos químicos, las concentraciones de ADN obtenido fueron menores que las observadas en el control y en los métodos enzimáticos. El ADN de los huesos proviene de los osteoblastos, los cuales se encuentran inmersos en la matriz ósea (Wisely et al., 2004). El efecto deletéreo de algunos agentes químicos sobre el ADN ha sido descrito con anterioridad (Steadman et al

2006) y podría ser la causa de estas diferencias. Las mayores concentraciones de ADN en huesos tratados enzimáticamente pueden ser el resultado del estado de los mismos, y la presencia de tejido blando remanente en ellos el cual aporta ADN en buena cantidad.

Indudablemente es necesario profundizar en el efecto de los tratamientos de limpieza aplicados y sus consecuencias sobre el ADN contenido en los huesos. Este estudio solo se limitó a evaluar la concentración, pureza y contaminación del ADN, y no la calidad del mismo. Si bien es cierto que existe una correlación positiva entre la concentración de ADN y el éxito de la amplificación y secuenciación de fragmentos específicos del mismo (Pacheco et al., 2022), no siempre grandes cantidades de ADN aseguran el éxito de estos procesos.

Los parámetros de pureza y la contaminación del ADN para los distintos tratamientos realizados fueron variables. En general, se observa que las muestras derivadas de los tratamientos químicos presentan los valores de pureza y contaminación más alejados de los óptimos. El protocolo de fenol-cloroformo es un procedimiento básico de extracción de ADN (Sambrook & Russell, 2006; McKiernan & Danielson, 2017; Samsuwan et al., 2018), de buenos rendimientos para muestras óseas, aun si el mismo puede favorecer la presencia de compuestos orgánicos en el material resultante. El uso de otros métodos específicos extracción, como la purificación por columna y aislamiento por perlas magnéticas, puede aumentar la concentración, pureza y bajar la contaminación del ADN. Sin embargo, este tipo de técnicas suelen ser económicamente demandantes, por lo cual el protocolo de fenol-cloroformo se convierte una alternativa viable (Samsuwan et al., 2018).

Entre los tratamientos evaluados el de mejor desempeño, considerando las variables analizadas, fue el $\text{KOH}^{5\% \text{ 2hs } 70^\circ\text{C}}$. Este tratamiento presentó valores mínimos de restos de tejidos blandos, al mismo tiempo que presentó menor porosidad que otros tratamientos químicos. Con respecto a la concentración, pureza y contaminación de ADN, para las tres variables presentó valores satisfactorios.

Aun si la utilización de la microscopia electrónica de barrido constituye un instrumento que proporciona imágenes tridimensionales de alta resolución, no es un recurso utilizado con frecuencia a la hora de evaluar el estado de conservación del material óseo (Lai et al., 2015). En este estudio, el uso del microscopio electrónico de barrido fue una valiosa herramienta a la hora de caracterizar cada uno de los tratamientos de limpieza ya que permitió observar partículas o restos de tejido no detectables a nivel macroscópico. Además, posibilitó la detección detallada de fracturas y grietas sobre la superficie del hueso.

Este trabajo evaluó la calidad ósea y del ADN luego de un breve periodo transcurrido desde la limpieza, por lo que no debería descartarse el potencial daño a largo plazo de la integridad ósea y del ADN debido a los tratamientos enzimáticos y químicos utilizados (Coy, 1980). A pesar de que se aplicaba un protocolo de enjuague luego del procedimiento, la acción enzimática y química podría continuar produciendo la degradación de los huesos. Seguramente este sea un aspecto a estudiar a futuro,

ya que los efectos del proceso de limpieza sobre los huesos constituyen un aspecto de vital importancia en colecciones biológicas, donde este material debe ser conservado en el tiempo.

REFERENCIAS

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2008). Fitting linear mixed-effects models using the lme4 package in R. *Presentation at Potsdam GLMM workshop*.
- Bemis, W. E., Hilton, E. J., Brown, B., Arrindell, R., Richmond, A. M., Little, C. D., Grande, L., Forey, P. L., & Nelson, G. J. (2004). Methods for preparing dry, partially articulated skeletons of osteichthyans, with notes on making Ridewood dissections of the cranial skeleton. *Copeia*, 2004(3), 603-609.
- Brown, T. A. (1999). Genetic material. En D. Carter & A. K. Walker (Eds.), *Care and conservation of natural history collections* (pp. 133-138). Oxford: Butterworth Heinemann.
- Chapman, D. I., & Chapman, N. (1969). The use of sodium perborate tetrahydrate (NaB03. 4H20) in the preparation of mammalian skeletons. *Journal of Zoology*, 159(4), 522-523.
- Clause, B. (1998). The Wistar Institute Archives: Rats (not mice) and history. *The Mendel newsletter; archival resources for the history of genetics & allied sciences*, 7-(7).
- Cook, J. A., Arai, S., Armién, B., Bates, J., Bonilla, C. A. C., Cortez, M. B. de S., Dunnum, J. L., Ferguson, A. W., Johnson, K. M., Khan, F. A. A., Paul, D. L., Reeder, D. M., Revelez, M. A., Simmons, N. B., Thiers, B. M., Thompson, C. W., Upham, N. S., Vanhove, M. P. M., Webala, P. W., ... Soltis, P. S. (2020). Integrating Biodiversity Infrastructure into Pathogen Discovery and Mitigation of Emerging Infectious Diseases. *BioScience*, 70(7), 531-534. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa064>
- Cossio-Bolaños, M., RT, H. F., & de Arruda, M. (2013). Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats. *Nutricion Hospitalaria*, 28(6), 2151-2156.
- Coy, J. (1980). Osteological preparation techniques 1. *Guild of Taxidermists Newsletter*, 5, 44-50.
- Davis, S., & Payne, S. (1992). 101 ways to deal with a dead hedgehog: Notes on the preparation of disarticulated skeletons for zoo-archaeological use. *Circaea*, 8(2), 95-104.
- Fenton, T. W., Cornelison, J., & Birkby, W. H. (2003). A fast and safe non-bleaching method for forensic skeletal preparation. *Journal of Forensic Sciences*, 48(2), JFS2002034.

- Fernández-Jalvo, Y., & Monfort, M. D. M. (2008). Experimental taphonomy in museums: Preparation protocols for skeletons and fossil vertebrates under the scanning electron microscopy. *Geobios*, 41(1), 157-181.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2018). *An R companion to applied regression*. Sage publications.
- Funk, V. A. (2018). Collections-based science in the 21st century. *Journal of Systematics and Evolution*, 56(3), 175-193.
- Harrison, X. A. (2014). Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. *PeerJ*, 2, e616.
- Hill, F. C. (1975). Techniques for skeletonizing vertebrates. *American Antiquity*, 40(2Part1), 215-219.
- ILAM, F. (2019). *Museo de Ciencias Naturales de La Plata*. <https://ilamdir.org/recurso/2237/museo-de-ciencias-naturales-de-la-plata>
- Jans, M. M., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Collins, M. J., & Kars, H. (2004). Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 31(1), 87-95.
- Jans, M. M. (2008). Microbial bioerosion of bone – a review. En M. Wisshak & L. Tapanila (Eds.), *Current developments in bioerosion* (pp. 397–413). Erlangen Earth Conference Series. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77598-0_20
- Kemp, C. (2015). Museums: The endangered dead. *Nature*, 518(7539), 292-294. <https://doi.org/10.1038/518292a>
- Lai, P., Khoo, L. S., Hilmi, S., Hasmi, A. H., Mahmood, M. S., Nurliza, A., & Wasi Ahmad, N. (2015). Effectiveness of bone cleaning process using chemical and entomology approaches: Time and cost. *The Malaysian Journal of Pathology*, 37, 123-135.
- Leeper, B. J. (2015). *Evaluation of current methods of soft tissue removal from bone*. University of Pittsburgh. Graduate Faculty of the Kenneth P. Dietrich School of Arts and Sciences, University of Pittsburgh.
- Lenth, R. (2022). *Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means*. R package version 1.7.2.
- 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.

- Mairs, S., Swift, B., & Rutty, G. N. (2004). Detergent: An alternative approach to traditional bone cleaning methods for forensic practice. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 25(4), 276-284.
- Majeed, Z. Z. (2009). Maceration of delicate osteological material by fly larvae. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(11), 2147-2149.
- Mateo-Lomba, P., Andreu, O., & Isabel, C. (2023). Experimental bone toolmaking: A proposal of technological analytical principles to knapped bones. *Journal of Lithic Studies*, 10(2), 24.
- McDonough, M. M., Parker, L. D., Rotzel McInerney, N., Campana, M. G., & Maldonado, J. E. (2018). Performance of commonly requested destructive museum samples for mammalian genomic studies. *Journal of Mammalogy*, 99(4), 789-802.
- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Chapter 21—Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. En G. P. Patrinos (Ed.), *Molecular Diagnostics (Third Edition)* (pp. 371-394). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3>
- Miller, S. E., Barrow, L. N., Ehlman, S. M., Goodheart, J. A., Greiman, S. E., Lutz, H. L., Misiewicz, T. M., Smith, S. M., Tan, M., & Thawley, C. J. (2020). Building natural history collections for the twenty-first century and beyond. *BioScience*, 70(8), 674-687.
- Moraes-Barros, N. de, & Morgante, J. S. (2007). A simple protocol for the extraction and sequence analysis of DNA from study skin of museum collections. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1181-1185.
- Muñoz-Saba, Y., Sánchez-Nivicela, J. C., Sierra-Durán, C. M., Vieda-Ortega, J. C., Amat-García, G., Muñoz, R., Casallas-Pabón, D., & Calvo-Roa, N. (2020). Cleaning osteological specimens with beetles of the genus *Dermestes* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Natural Science Collections*, 7, 72-82.
- Museo Nacional de Ciencias Naturales (Spain), Sanchíz, B., & Rodríguez, J. B. (1994). *Manual de catalogación y gestión de las colecciones científicas de Historia Natural*. Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Ossian, C. R. (1970). Preparation of disarticulated skeletons using enzyme-based laundry" pre-soakers". *Copeia*, 1, 199-200.

- Pacheco, C., Lobo, D., Silva, P., Álvares, F., García, E. J., Castro, D., Layna, J. F., López-Bao, J. V., & Godinho, R. (2022). Assessing the performance of historical skins and bones for museomics using wolf specimens as a case study. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *10*, 970249.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & Team, R. C. (2007). *Linear and nonlinear mixed effects models* (R package version 3.57). <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Popp, A. I., Lodovichi, M. V., Castillo, D. F., Casanave, E. B., & Sidorkewicz, N. S. (2023). Effects of different traditional methods of cleaning skeletal material: Preliminary evaluation based on scanning electron microscopy. *Journal of Plastination*, *35*(1), 1–19.
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Reid, G. (1994). The preparation and preservation of collections. En S. A. Moore, J. A. Batten, & D. J. Morris (Eds.) *Manual of natural history curatorship* (pp. 28-56). HMSO.
- Rennick, S. L., Fenton, T. W., & Foran, D. R. (2005). The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *Journal of Forensic Sciences*, *50*(5), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2005.00100.x>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(1), pdb. prot4455. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
- Samsuwan, J., Somboonchokepisal, T., Akaraputtiporn, T., Srimuang, T., Phuengsukdaeng, P., Suwannarat, A., Mutirangura, A., & Kitkumthorn, N. (2018). A method for extracting DNA from hard tissues for use in forensic identification. *Biomedical Reports*, *9*(5), 433-438. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1148>
- Sandström, B. (1969). Enzymatic maceration of delicate bone and small skeletons. *Cells Tissues Organs*, *74*(3), 487-488.
- Simmons, J. E. (2014). *Fluid preservation: A comprehensive reference*. Rowman & Littlefield.
- Simonsen, K. P., Rasmussen, A. R., Mathisen, P., Petersen, H., & Borup, F. (2011). A fast preparation of skeletal materials using enzyme maceration. *Journal of forensic sciences*, *56*(2), 480-484.

- Smith, C. I., Nielsen–Marsh, C. M., Jans, M. M. E., Arthur, P., Nord, A. G., & Collins, M. J. (2002). The strange case of Apigliano: Early ‘fossilization’ of medieval bone in southern Italy. *Archaeometry*, *44*(3), 405-415.
- Steadman, D., DiAntonio, L., Wilson, J., Sheridan, K., & Tammariello, S. (2006). The Effects of Chemical and Heat Maceration Techniques on the Recovery of Nuclear and Mitochondrial DNA from Bone*. *Journal of forensic sciences*, *51*, 11-17. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2005.00001.x>
- Teta, P. (2021). Biodiversidad, colecciones biológicas y colecta de especímenes: ¿Por qué tenemos que seguir colectando? *Mastozoología neotropical*, *28*(1), 1-1.
- Thompson, M. C. (2015). *Preparing skeletons for research and teaching from preserved human specimens* (Tesis de maestría). California State University, East Bay.
- Wandeler, P., Hoeck, P. E., & Keller, L. F. (2007). Back to the future: Museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, *22*(12), 634-642.
- Wisely, S. M., Maldonado, J. E., & Fleischer, R. C. (2004). A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. *Conservation Genetics*, *5*(1), 105-107. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000014061.23088.ad>

ANEXO 1

Protocolo de extracción de fenol-cloroformo

- 1- En un tubo de 1,5 ml colocar 5 mg de hueso previamente molido en mortero
- 2- Añadir 300 μ l de buffer de lisis [0,75 mol/l NaCl, 0,024 mol/l EDTA (pH 8,0), 10% dodecil sulfato sódico y 20 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml)].
- 3- Incubar toda la noche a 50°C con una rotación constante de 0,25 RPM.
- 4- Centrifugar (4°C por 2') y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
- 5- Agregar un volumen equivalente de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporciones de 25/24/1. Mezclar por inversión.
- 6- Centrifugar a máxima velocidad a 4°C por 2'.
- 7- Remover la fase superior (sobrenadante) y transferir a un nuevo tubo.
- 8- Precipitar ADN agregando 1/10 V de Acetato de Na 3M. Mezclar por inversión.
- 9- Agregar 2V/V de etanol 100% frío.
- 10- Centrifugar por 30' a 4°C a máxima velocidad.
- 11- Descartar sobrenadante y agregar 500 μ l de etanol 70% frío.
- 12- Lavar y secar al aire, y resuspender en 50 μ l de buffer TE.

ANEXO 2

Tabla A. Significancia de las diferencias en el porcentaje de restos de tejido remanente sobre la superficie de hueso analizada, obtenida en los diferentes tratamientos de limpieza (Test de Tukey).

*: $\leq 0,05$; **: $< 0,001$; ns: $> 0,05$.

	Control	Jabón 10% 2h 40°C	Jabón 10% 2h 70°C	Jabón 10% 4h 40°C	Jabón 10% 4h 70°C	Jabón 15% 2h 40°C	Jabón 15% 2h 70°C	Jabón 15% 4h 40°C	Jabón 15% 4h 70°C	KOH 5% 2h 40°C	KOH 5% 2h 70°C	KOH 5% 4h 40°C	KOH 10% 2h 40°C
Control		ns	**	**	**	**							
Jabón 10% 2h 40°C			ns	**	**	**	**						
Jabón 10% 2h 70°C				ns	ns	ns	ns	*	ns	**	ns	ns	**
Jabón 10% 4h 40°C					ns	ns	ns	ns	ns	**	**	**	**
Jabón 10% 4h 70°C						ns	ns	*	ns	**	ns	ns	**
Jabón 15% 2h 40°C							ns	ns	ns	**	**	**	**
Jabón 15% 2h 70°C								ns	ns	**	ns	ns	**
Jabón 15% 4h 40°C									ns	**	**	**	**
Jabón 15% 4h 70°C										**	**	**	**
KOH 5% 2h 40°C											ns	ns	ns
KOH 5% 2h 70°C												ns	ns
KOH 5% 4h 40°C													ns
KOH 10% 2h 40°C													

Tabla B. Significancia de las diferencias en la concentración del ADN extraído de huesos sometidos a diferentes tratamientos de limpieza (Test de Tukey). *: $\leq 0,05$; **: $< 0,001$; ns: $> 0,05$

	Control	Jabón 10% 2h 40°C	Jabón 10% 2h 70°C	Jabón 10% 4h 40°C	Jabón 10% 4h 70°C	Jabón 15% 2h 40°C	Jabón 15% 2h 70°C	Jabón 15% 4h 40°C	Jabón 15% 4h 70°C	KOH 5% 2h 40°C	KOH 5% 2h 70°C	KOH 5% 4h 40°C	KOH 5% 4h 70°C	KOH 10% 2h 40°C	KOH 10% 2h 70°C	KOH 10% 4h 40°C	KOH 10% 4h 70°C
Control		ns	**	**	**	**	*	**	**	**							
Jabón 10% 2h 40°C			ns	**	ns	**	**	ns	ns	**	**						
Jabón 10% 2h 70°C				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Jabón 10% 4h 40°C					ns	ns	ns	ns	ns	**	*	**	**	*	*	**	**
Jabón 10% 4h 70°C						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Jabón 15% 2h 40°C							ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
Jabón 15% 2h 70°C								ns	ns	**	**	**	**	*	**	**	**
Jabón 15% 4h 40°C									ns	**	ns	*	*	ns	ns	**	*
Jabón 15% 4h 70°C										**	ns	*	*	ns	ns	*	*
KOH 5% 2h 40°C											ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KOH 5% 2h 70°C												ns	ns	ns	ns	ns	ns
KOH 5% 4h 40°C													ns	ns	ns	ns	ns
KOH 5% 4h 70°C														ns	ns	ns	ns
KOH 10% 2h 40°C															ns	ns	ns
KOH 10% 2h 70°C																ns	ns
KOH 10% 4h 40°C																	ns
KOH 10% 4h 70°C																	

Tabla C. Significancia de las diferencias en el grado de pureza del ADN extraído de huesos sometidos a diferentes tratamientos de limpieza (Test de Tukey). *: $\leq 0,05$; **: $< 0,001$; ns: $> 0,05$.

	Control	Jabón 10% 2h 40°C	Jabón 10% 2h 70°C	Jabón 10% 4h 40°C	Jabón 10% 4h 70°C	Jabón 15% 2h 40°C	Jabón 15% 2h 70°C	Jabón 15% 4h 40°C	Jabón 15% 4h 70°C	KOH 5% 2h 40°C	KOH 5% 2h 70°C	KOH 5% 4h 40°C	KOH 5% 4h 70°C	KOH 10% 2h 40°C	KOH 10% 2h 70°C	KOH 10% 4h 40°C	KOH 10% 4h 70°C
Control		ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns	**	**	**	ns
Jabón 10% 2h 40°C			ns	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns						
Jabón 10% 2h 70°C				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
Jabón 10% 4h 40°C					ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	**	ns	**	ns
Jabón 10% 4h 70°C						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Jabón 15% 2h 40°C							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Jabón 15% 2h 70°C								ns	ns	**	ns	*	ns	**	ns	**	ns
Jabón 15% 4h 40°C									ns	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns
Jabón 15% 4h 70°C										*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns
KOH 5% 2h 40°C											**	ns	ns	ns	ns	ns	*
KOH 5% 2h 70°C												*	ns	**	ns	**	ns
KOH 5% 4h 40°C													ns	ns	ns	ns	ns
KOH 5% 4h 70°C														*	ns	*	ns
KOH 10% 2h 40°C															ns	ns	**
KOH 10% 2h 70°C																ns	ns
KOH 10% 4h 40°C																	**
KOH 10% 4h 70°C																	

Tabla D. Significancia de las diferencias en el grado de contaminación del ADN extraído de huesos sometidos a diferentes tratamientos de limpieza (Test de Tukey). *: $\leq 0,05$; **: $< 0,001$; ns: $> 0,05$.

	Control	Jabón 10% 2h 40°C	Jabón 10% 2h 70°C	Jabón 10% 4h 40°C	Jabón 10% 4h 70°C	Jabón 15% 2h 40°C	Jabón 15% 2h 70°C	Jabón 15% 4h 40°C	Jabón 15% 4h 70°C	KOH 5% 2h 40°C	KOH 5% 2h 70°C	KOH 5% 4h 40°C	KOH 5% 4h 70°C	KOH 10% 2h 40°C	KOH 10% 2h 70°C	KOH 10% 4h 40°C	KOH 10% 4h 70°C
Control		ns	ns	ns	ns	*	ns	Ns	ns	**	ns	**	ns	**	**	**	ns
Jabón 10% 2h 40°C			ns	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns						
Jabón 10% 2h 70°C				ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
Jabón 10% 4h 40°C					ns	ns	ns	Ns	ns	**	ns	*	ns	**	ns	**	ns
Jabón 10% 4h 70°C						ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Jabón 15% 2h 40°C							ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Jabón 15% 2h 70°C								Ns	ns	**	ns	*	ns	**	ns	**	ns
Jabón 15% 4h 40°C									ns	*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns
Jabón 15% 4h 70°C										*	ns	ns	ns	**	ns	**	ns
KOH 5% 2h 40°C											**	ns	ns	ns	ns	ns	*
KOH 5% 2h 70°C												*	ns	**	ns	**	ns
KOH 5% 4h 40°C													ns	ns	ns	ns	ns
KOH 5% 4h 70°C														*	ns	*	ns
KOH 10% 2h 40°C															ns	ns	**
KOH 10% 2h 70°C																ns	ns
KOH 10% 4h 40°C																	**
KOH 10% 4h 70°C																	